

**Untersuchungen *in vitro* zu epigenetisch  
wirksamen Immunmodulatoren bei der  
Pathogen-spezifischen Mastitis des Rindes**

von Laura E. Macías Luaces

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Untersuchungen *in vitro* zu epigenetisch wirksamen  
Immunmodulatoren bei der Pathogen-spezifischen  
Mastitis des Rindes**

von Laura E. Macías Luaces

aus Santiago de Compostela

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Wolfram  
Petzl

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Andrea Stockmaier-Didier

**Tag der Promotion:** 25.02.2019

Für meine Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>I.</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>II.</b>  | <b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>                                  | <b>3</b>  |
| <b>1.</b>   | <b>Die Mastitis des Rindes .....</b>                             | <b>3</b>  |
| 1.1.        | Bedeutung.....   | 3         |
| 1.2.        | Ätiologie und Pathogenese.....                                   | 4         |
| 1.3.        | Therapie- und Prophylaxekonzepte.....                            | 8         |
| <b>2.</b>   | <b>Epigenetische Mechanismen der Inflammationssteuerung.....</b> | <b>11</b> |
| 2.1.        | Methylierung und Acetylierung von Histonen.....                  | 11        |
| 2.2.        | Epigenetisch wirksame Immunmodulatoren.....                      | 12        |
| 2.3.        | Epigenetische Inflammationssteuerung beim Rind.....              | 15        |
| <b>III.</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                               | <b>17</b> |
| <b>1.</b>   | <b>Geräte .....</b>  | <b>17</b> |
| 1.1.        | Geräte für intrazelluläre Immunfluoreszenz .....                 | 17        |
| 1.2.        | Geräte für die Kultivierung von Gewebeexplants.....              | 18        |
| 1.3.        | Geräte für molekularbiologische Untersuchungen.....              | 18        |
| <b>2.</b>   | <b>Material .....</b>  | <b>19</b> |
| 2.1.        | Laborbedarf für intrazelluläre Immunfluoreszenz .....            | 19        |
| 2.2.        | Klinikbedarf .....   | 20        |
| 2.3.        | Laborbedarf für die Kultivierung von Gewebeexplants.....         | 20        |
| 2.4.        | Laborbedarf und Reagenzien für Bakteriologie .....               | 21        |
| 2.5.        | Laborbedarf für das Testverfahren „AlphaLISA®“ .....             | 22        |
| 2.6.        | Laborbedarf für molekularbiologische Untersuchungen.....         | 22        |
| 2.7.        | Reagenzien für intrazelluläre Immunfluoreszenz .....             | 23        |
| 2.8.        | Reagenzien für die Explantkultur.....                            | 24        |
| 2.9.        | Reagenzien für das Testverfahren „AlphaLISA®“ .....              | 25        |
| 2.10.       | Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen.....          | 26        |
| 2.11.       | Kulturmedien, Puffer und Lösungen .....                          | 26        |
| 2.12.       | Primer .....   | 30        |
| 2.13.       | Versuchstiere .....  | 31        |
| <b>3.</b>   | <b>METHODEN .....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1.        | Durchflusszytometrie .....                                       | 35        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 3.2.         | Intrazelluläre Immunfluoreszenz Färbung .....  | 36         |
| 3.3.         | Explant-Modell.....  | 43         |
| 3.4.         | Beurteilung der Gewebevitalität.....   | 51         |
| 3.5.         | Funktionelle Untersuchungen zur Chemotaxis von PMN .....   | 52         |
| 3.6.         | Fluo-4 Färbung.....  | 55         |
| 3.7.         | AlphaLISA® .....   | 58         |
| 3.8.         | Molekularbiologische Untersuchungen.....   | 61         |
| 3.9.         | Statistische Auswertung .....  | 67         |
| <b>IV.</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>69</b>  |
| <b>1.</b>    | <b>Methylierungs- und Acetylierungsmuster in PMN aus Blut und Milch.....</b>   | <b>69</b>  |
| 1.1.         | Zytobakteriologische Befunde in der Milch.....   | 69         |
| 1.2.         | Vergleich des Methylierungs- und Acetylierungsmusters in PMN aus Blut und Milch .....  | 70         |
| 1.3.         | Vergleich des Methylierungs- und Acetylierungsmusters in PMN vor und nach aktiver Migration <i>in vitro</i> .....                  | 71         |
| <b>2.</b>    | <b>Einfluss epigenetisch wirksamer Immunmodulatoren auf die Pathogen-Wirt-Interaktion in mammärem Gewebe.....</b>                  | <b>73</b>  |
| 2.1.         | Einfluss von VitD <sub>3</sub> .....   | 73         |
| 2.2.         | Einfluss von SAHA und S2101.....   | 75         |
| <b>3.</b>    | <b>Vitalitätstest .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>V.</b>    | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>102</b> |
| 1.1.         | Epigenetisch wirksame Substanzen modulieren die Immunantwort von mammärem Gewebe gegenüber Mastitisserregern <i>in vitro</i> ..... | 102        |
| 1.2.         | Methylierungs- und Acetylierungsmuster boviner PMN in Blut und Milch .....   | 110        |
| 1.3.         | Schlussbetrachtung und Ausblick .....  | 111        |
| <b>VI.</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>VII.</b>  | <b>SUMMARY.....</b>  | <b>116</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>118</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>135</b> |

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                  |  |
|------------------|--|
| °C               | Grad Celsius   |
| $\alpha$         | Alpha  |
| $\beta$          | Beta   |
| $\gamma$         | Gamma  |
| AK               | Antikörper   |
| AMP              | antimikrobielle Peptide  |
| APS              | Antibiotic-Antimycotic   |
| Aqua dest.       | Aqua destillata (destilliertes Wasser)                                 |
| BHI              | Brain Heart Infusion Broth   |
| BU               | Bakteriologische Untersuchung  |
| bzw.             | beziehungsweise  |
| ca.              | circa (lateinisch: etwa, ungefähr)                                     |
| $\text{Ca}^{2+}$ | Calcium  |
| cm               | Zentimeter   |
| CMT              | California Mastitis Test   |
| $\text{CO}_2$    | Kohlendioxid   |
| CSB              | Columbia-Schafblut-Agar  |
| $\text{C}_q$     | quantification cycle   |
| d. h.            | das heißt  |
| DMEM-F12         | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / Ham's Nutrient Mixture F12 |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid   |
| DNA              | Desoxyribonucleinsäure   |
| dNTPs            | Desoxynucleotid Triphosphat  |



|                |  |
|----------------|--|
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat   |
| EP             | Euterparenchym   |
| et al.         | et alii (lateinisch: und andere)   |
| etc.           | et cetera (lateinisch: und weiteres)   |
| FL1; 3         | Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz<br><br>FL1 = Grünfluoreszenz, $530 \pm 15$ nm<br><br>FL3=Rotfluoreszenz, $> 650$ nm |
| FSC            | Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des Fluoreszenz-Durchflusszytometer  |
| g              | Gramm  |
| G              | Gauge  |
| h              | hora (lateinisch: Stunde)  |
| HL             | Euterviertel hinten links  |
| HR             | Euterviertel hinten rechts   |
| ICIF           | Intrazelluläre Immunfluoreszenz  |
| IL             | Interleukin  |
| KBE            | Koloniebildende Einheit  |
| KNS            | Koagulase negative Staphylokokken  |
| L              | Liter  |
| LMU            | Ludwig-Maximilians-Universität   |
| LPS            | Lipopolysaccharid  |
| $\mu$          | mikro (mal $10^{-6}$ )   |
| $\mu\text{g}$  | Mikrogramm ( $10^{-6}$ g)  |

|               |   |
|---------------|---|
| $\mu\text{L}$ | Mikroliter ( $10^{-6}$ L)   |
| $\mu\text{m}$ | Mikrometer ( $10^{-6}$ m)   |
| m             | milli (mal $10^{-3}$ )  |
| MeanFL        | mittlere Fluoreszenzintensität  |
| MEC           | Milchdrüsenepithelzellen  |
| min           | Minute(n)   |
| mL            | Milliliter ( $10^{-3}$ L)   |
| mm            | Millimeter  |
| mol           | Menge eines chemisch einheitlichen Stoffes, die seinem relativen Molekulargewicht in Gramm entspricht |
| MR            | Migrationsrate  |
| MW            | Mittelwert  |
| n             | nano (mal $10^{-9}$ )   |
| n =           | Anzahl der Einzelbeobachtungen  |
| nm            | Nanometer   |
| nmol          | Nanomol ( $10^{-9}$ mol)  |
| NaCl          | Natriumchlorid  |
| NK            | Negativkontrolle  |
| Nr.           | Nummer  |
| obB           | ohne besonderen Befund  |
| OD            | optische Dichte   |
| OW            | oberes Well   |
| P =           | Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen                         |
| PBS           | Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| PCR               | Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)                               |
| PFA               | Paraformaldehyd  |
| pH                | Potentia hydrogenii (lateinisch: Wasserstoffionen-Exponent)                        |
| PK                | Positivkontrolle   |
| PMN               | Polymorphonuclear Neutrophils (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)          |
| PJ                | Propidiumjodid   |
| RNA               | Ribonukleinsäure   |
| rpm               | Rounds per minute (Runden pro Minute)  |
| RT                | Reverse Transkription  |
| s                 | Sekunde(n)   |
| <i>S. aureus</i>  | <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| SCC               | Somatic Cell Count (Somatische Zellen in der Milch)                                |
| SD                | Standardabweichung   |
| Spp.              | Spezies  |
| SSC               | Seitwärtsstreuung (side scatter) Messparameter des Fluoreszenz Durchflusszytometer |
| Str. spp          | <i>Streptococcus</i> Spezies   |
| Tab.              | Tabelle  |
| TNF               | Tumor-Nekrose-Faktor   |
| TSB               | Tryptic Soy Broth  |
| UW                | unteres Well   |
| v.a.              | vor allem  |
| VitD <sub>3</sub> | Vitamin D3   |
| VL                | Euterviertel vorne links   |

|          |  |
|----------|--|
| VR       | Euterviertel vorne rechts                                  |
| VRB-Agar | Violett-Red-Bile-Agar (Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar) |
| z. B.    | zum Beispiel   |
| ZZ       | Zitzenzisterne   |

## I. EINLEITUNG

Die Mastitis beim Rind ist weltweit die häufigste und kostenintensivste Erkrankung in Milchviehbetrieben. Pro Laktation erkranken etwa 30 % der Kühe an einer Mastitis. Die nachfolgenden Folgeschäden beinhalten überwiegend Milchverluste, vorzeitige Abgänge und Behandlungskosten. Mastitiden werden fast ausschließlich durch intramammäre, bakterielle Infektionen ausgelöst. *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sind zwei der wichtigsten Mastitiserreger, rufen jedoch ein sehr unterschiedliches, Pathogen-spezifisches Erkrankungsbild hervor. Die charakteristische Ausprägung einer *E.-coli*-Mastitis beinhaltet eine akute Entzündung und systemische Krankheitssymptome: Fieber, Apathie, Anorexie, starker Milchrückgang und hochgradige Sekretveränderungen bis hin zu akuten Todesfällen. Hierbei gilt vor allem die überschießende Immunantwort der Kuh als zentrales Problem. Der Verlauf einer durch *S. aureus* hervorgerufenen Mastitis äußert sich meist durch einen subklinischen und chronischen Verlauf. Die zu geringe Immunantwort führt zu persistenten Infektionen und chronischen Schäden am Euter. Betroffene Kühe büßen 25 % ihrer Milchleistung ein und stellen ein ständiges Erregerreservoir in der Herde dar.

Die weltweite Bekämpfung der Mastitis erfordert vielschichtige Maßnahmen auf den Milchviehbetrieben. Oberste Priorität liegt hierbei in der Mastitisprophylaxe durch Herdmanagement Maßnahmen. Der Fokus liegt auf einer Optimierung der Melkhygiene, der Keimdruckminderung und des selektiven Trockenstellens.

Bei klinischen Mastitisfällen ist eine Behandlung während der Laktation oftmals ratsam, abhängig von der Schwere der Erkrankung und dem ursächlichen Pathogen. Die am häufigsten eingesetzten Medikamente gegen Mastitis sind nach wie vor Antibiotika. Der Therapieerfolg hängt hierbei besonders von dem ursächlichen Erreger, der Erkrankungshäufigkeit und der Behandlungsdauer ab.

Antibiotika sind das bedeutendste Instrument gegen bakterielle Erkrankungen, jedoch nimmt weltweit die Zahl an antibiotikaresistenten Bakterien zu. Diese Resistenzen betreffen zwar auch Nutztiere, gelten aber vor allem als kritisch in der Humanmedizin. Der gesellschaftspolitische Druck, den Einsatz von Antibiotika in der Nutztiermedizin zu verringern, ist stark gestiegen in den letzten Jahren. Obwohl die Resistenzlage bei Mastitisserregern derzeit nicht besorgniserregend ist, wird der Einsatz von Antibiotika bei

der Mastitisbekämpfung auch immer restriktiver. Alternative Behandlungsstrategien fehlen derzeit meist. Deshalb werden neue Wege der Mastitisbehandlung und -prophylaxe gesucht. Neue Erkenntnisse aus der Forschung deuten immer mehr darauf hin, dass die gezielte Modulation angeborener Immunmechanismen hier einen neuen Ansatzpunkt bietet.

Es ist bekannt, dass epigenetische Mechanismen einen modulierenden Einfluss auf die Immunantwort haben. Durch reversiblen Histon-Modifikationen, werden Genabschnitte an Chromosomen moduliert, ohne dass sich die DNA-Sequenz ändert. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung oder Abschaltung von bestimmten Genen. Epigenetisch wirksame Immunmodulatoren beeinflussen die Aktivität verschiedener Histon-modifizierender Enzyme und haben somit eine Wirkung auf die Genexpression unterschiedlicher immunrelevanter Genregionen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, den Einfluss drei epigenetisch wirksamer Immunmodulatoren (Vitamin D<sub>3</sub>, SAHA, S2101) auf die frühe Immunantwort im Euter zu untersuchen. Dazu wurden bovine Explants der Zitzenzisterne (ZZ) und des Euterparenchyms (EP) *in vitro* mit *E. coli* und *S. aureus* unter Anwesenheit von Immunmodulatoren inkubiert. Die Immunantwort wurde sowohl auf funktioneller und transkriptioneller Ebene, als auch auf Produktebene analysiert.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das epigenetische Muster von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus Blut und Milch zu untersuchen. PMN gelten als Haupteffektorzellen bei der bovinen Mastitis. Hier sollten durch intrazelluläre Immunfluoreszenz vor allem unterschiedliche epigenetische Muster von PMN vor und nach Pathogen-Kontakt untersucht werden und Hinweise auf deren Funktionalität liefern.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines wissenschaftlichen Gesamtprojekts um bessere Kenntnisse über die Pathogen-spezifische bovine Mastitis zu erlangen. Durch den Einsatz potentieller Immunmodulatoren zur Inflammationssteuerung, sollen langfristige neue Wege in der Mastitisbekämpfung beim Rind aufgezeigt werden. Die Verhinderung überschießender Inflammation und die verbesserte Ausheilung intramammärer Infektionen durch Förderung endogener antimikrobieller Mechanismen sollen nachhaltig das Tierwohl verbessern und den Antibiotikaeinsatz reduzieren.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Die Mastitis des Rindes**

Die Mastitis ist als eine Entzündung der Milchdrüse definiert. Diese Entzündung kann sich in einer akuten oder einer chronischen Phase befinden. Die Symptome können sich klinisch (durch Sinnesprüfung feststellbar) oder subklinisch (es zeigen sich keine makroskopischen Veränderungen) äußern. Bei der Milchkuh sind Bakterien die häufigsten Verursacher von Mastitiden (WENDT et al., 1994).

Beim Rind stellt die Mastitis eine multifaktorielle Krankheit dar. Die Ausprägung wird durch den Wirt, das verursachende Pathogen und die Umgebung beeinflusst. Die Bedingungen der Kuh (Alter, Laktationsnummer und -phase, Immunstatus) spielen eine wichtige Rolle bei der Schwere und Dauer der Mastitis. Um das Auftreten von Mastitiden zu minimieren ist es wichtig, die Umgebung (vor allem durch Herdenmanagement) sowohl bei der täglichen Melkroutine, aber auch bei durchgeführten Tätigkeiten wie z.B. dem selektiven Trockenstellen, zu kontrollieren und zu verbessern (HALASA et al., 2007; MCDOUGALL et al., 2009). Die Qualität und Menge der Fütterungsration haben ebenfalls einen Einfluss auf die Ausprägung der Mastitis. Die Futteraufnahme und Milchproduktion werden durch eine Mastitis negativ beeinflusst, und korrelieren mit der Schwere der Mastitis (LIPPOLIS et al., 2011).

#### **1.1. Bedeutung**

Beim Rind ist die Mastitis eine der häufigsten und relevantesten Krankheiten in Milchviehbetrieben weltweit (HALASA et al., 2007). Betroffene Kühe leiden nicht nur unter Schmerzen und Unbehagen (SCHUKKEN et al., 2011), sondern ändern sogar ihr Verhalten (z.B. Minderung der Futteraufnahme) (SEPULVEDA-VARAS et al., 2016).

Die wirtschaftlichen Verluste beschränken sich nicht nur auf die verminderte Milchleistung und den Leistungsausfall während der Behandlung, es entstehen auch zusätzliche Tierarztkosten. Weiterhin ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die betroffenen Kühe früher aus der Herde entfernt werden (SEEGERS et al., 2003; HALASA et al., 2007).

Eine verminderte Milchleistung als Folge der Mastitis kann v.a. bei einer Mastitis aufgrund von *E. coli* beobachtet werden. Dieser Milchverlust im Vergleich zu gesunden Tieren ist nicht nur während der Infektion feststellbar, sondern kann bis zu 70 Tage nach der Diagnose beobachtet werden (SCHUKKEN et al., 2009).

Bei der Mastitis ist nicht immer nur das Euter betroffen. Das gesamte Allgemeinbefinden der Kuh kann gestört sein (WENDT et al., 1994). Die Mastitis kann sich auch negativ auf die Reproduktion der einzelnen Kuh auswirken. Die Folge ist eine geringere Konzeptionsrate in der Herde (KUMAR et al., 2017).

### **1.2. Ätiologie und Pathogenese**

#### *Abwehrmechanismen des Euters*

Der Strichkanal und der Schließmuskel bilden die erste physikalische Barriere gegenüber aufsteigenden Infektionen im Bereich des Euters. Der verschlossene Schließmuskel vermeidet den Eintritt von Erregern und öffnet sich nur während des Milchflusses (WENDT et al., 1994). Die ersten chemischen Barrieren der Zitze sind das Keratin und das Laktoferrin (RIOLLET et al., 2000). Neuere Studien zeigen weiterhin das Vorhandensein antimikrobiell wirksamer S100-Proteine in distalen Anteilen der Zitze auf (REGENHARD et al., 2010; SMOLENSKI et al., 2014; LIND et al., 2015). Die Abwehrmechanismen des Euters werden durch das angeborene Immunsystem dominiert. Hierunter fallen eine Vielzahl zellulärer aber auch humoraler Mechanismen (WERLING et al., 2006).

Gesunde Milch enthält nur eine geringe Anzahl an Immunzellen. Die häufigsten sind PMN und Lymphozyten (MEHNE et al., 2010). Bei einer intramammären Infektion kommt es zur Aktivierung von Milchdrüsenepithelzellen (MEC). Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Mastitiserreger und der Produktion von inflammatorischen Zytokinen (LAHOUASSA et al., 2007; YANG et al., 2008; GUNTHER et al., 2009). Wenn ein Erreger oder dessen Partikel in Kontakt mit den MEC kommt, wird eine Kaskade an zellulären und humoralen Faktoren aktiviert. Die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) bewirkt über Zytokine und Chemokine eine Rekrutierung von Phagozyten um den Erreger zu bekämpfen (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; SCHUKKEN et al., 2011). Eine Folge der Kaskade ist die systemische Hochregulation von inflammatorischen Zytokinen, welche dann in der Milch nachgewiesen werden können (YANG et al., 2008;



GUNTHER et al., 2010). Die Anzahl von Leukozyten und MEC in der Milch wird als somatische Zellzahl (auch „somatic cell count“ oder SCC) bezeichnet (WENDT et al., 1994). Der Anstieg des SCC gilt als wichtigster diagnostischer Marker bei der Mastitis.

Neben den beschriebenen zellulären Faktoren spielen bei der Immunabwehr eine Reihe von humoralen Faktoren eine wichtige Rolle. Hierzu zählen vor allem antimikrobielle Peptide (AMP, z.B. Defensine, S100-Proteine, Cathelicidine), aber auch Laktoferrin, Lysozym, Komplementfaktoren, Zytokine und Chemokine (RAINARD & RIOLLET, 2006). Die Rolle der Immunglobuline in der Milch hinsichtlich der Abwehrvorgänge ist bis heute nicht geklärt.

Die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine beim Rind sind der Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und das Interleukin (IL)-1 $\beta$ . Diese Zytokine regulieren die Immunantwort sowohl lokal als auch systemisch. Sie aktivieren verschiedene Zellen, lösen die Ausschüttung weiterer Zytokine und Enzyme aus, sind aber auch für Zellvermehrung und Apoptose verantwortlich (SCHUKKEN et al., 2011). Manche Zytokine wie IL-4 oder IL-10 hemmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (SCHUKKEN et al., 2011). Das am besten erforschte Chemokin des bovinen Euters ist IL-8 (SCHUKKEN et al., 2011). IL-8 ist in der Genregion *CXCL8* kodiert. *CXCL8* wird mit als erstes Gen von MEC exprimiert, wenn eine Inflammation der Milchdrüse stattfindet (GUNTHER et al., 2011; PETZL et al., 2016). IL-8 lockt PMN aus dem peripheren Blut zum Ort der Pathogen-Wirt-Interaktion. Deshalb wird seine Aktivierung oftmals als die erste Stufe der zellulären Immunität der Milchdrüse beschrieben (RIOLLET et al., 2000).

### *Mastitiserreger*

Die Mastitis des Rindes wird in über 95 % der Fälle von Bakterien verursacht (SCHUKKEN et al., 2011). Die am häufigsten nachgewiesenen Erreger sind *Streptococcus uberis* (*Sc. uberis*), *E. coli*, *S. aureus* und Koagulase-negative-Staphylokokken (KNS) (SAC C VS DISEASE SURVEILLANCE REPORT, 2011). Die Ausprägung, der Schweregrad und die Dauer der Mastitis sind unter anderem von der Spezies und dem Stamm des Erregers abhängig (SCHUKKEN et al., 2011).

Die Bakterien sind entweder kuh- oder umweltassoziiert. Manche Bakterien wie

*E. coli* sind charakteristische Umweltkeime, andere wie *S. aureus* werden häufig durch Kuhkontakt übertragen und gehören zur Gruppe der kontagiösen Mastitiserreger (WENDT et al., 1994). Allerdings gibt es Bakterien, die sowohl umweltassoziiert sind, als auch kontagiös wirken können, wie z.B. *Sc. uberis* (RATO et al., 2008).

Die Eigenschaft gramnegativer Bakterien, Laktose zu verwerten vereinfacht die Kolonisierung in der Milchdrüse. Diese Eigenschaft kann auch benutzt werden, um diese Bakterien im Labor zu identifizieren (III.3.2.3). Von den gramnegativen Bakterien ist *E. coli* am bedeutendsten. Coliforme Bakterien wie *E. coli* lösen in der Regel eine klinische und akute Mastitis aus (SCHUKKEN et al., 2011), die aber häufig durch die adäquate Immunabwehr des Wirtes alleine ausheilt. Eine überschießende Zytokin-Ausschüttung kann wiederum zu einem schweren systemisch-inflammatorischen Response-Syndrom bei der Kuh führen (BURVENICH et al., 2003). Die Keimkonzentration (KBE) von *E. coli* und die Produktion von IL-8 im Eutergewebe korrelieren. Wenn die Konzentration von *E. coli* im Euter steigt, erhöht sich auch die Produktion von IL-8 (BREYNE et al., 2018).

Manche intramammären Infektionen persistieren im Euter. Grampositive Bakterien wie *S. aureus* und KNS sind hierfür Hauptverursacher (SCHUKKEN et al., 2011). *S. aureus* verursacht häufig eine nicht ausheilende Mastitis, die chronisch wird. Dies führt zu einem Versagen der Therapie mit oftmals erhöhtem Antibiotikaeinsatz. Zudem ist *S. aureus* nicht durch eine Impfung zu kontrollieren (SMITH et al., 2006; PEREIRA et al., 2011). Ein weiterer Nachteil ist, dass ein infiziertes Tier ein Reservoir für neue Infektionen in der Herde darstellt (SMITH et al., 2006). *S. aureus* wird oft intermittierend ausgeschieden und kann deshalb nicht immer in der Milch diagnostiziert werden (SEARS et al., 1990).

### *Klinische Ausprägung*

Die Mastitis kann durch grobsinnlich erfassbare klinische Symptome einer Entzündung charakterisiert sein (entweder lokal im Euter oder systemische Symptome) oder nur durch diagnostische Methoden wie z.B. anhand des SCC nachgewiesen werden. Im ersten Fall handelt es sich um eine klinische Mastitis, im zweiten Fall um eine subklinische Mastitis (WENDT et al., 1994).

Manche Erreger sind häufiger mit einer Form der Mastitis assoziiert, z.B. produziert *E. coli* meistens transiente klinische Verläufe und *S. aureus* häufiger chronische, subklinische Mastitiden (WENZ et al., 2006). Die Schwere einer von *E. coli* verursachten Mastitis korreliert dabei direkt mit der Anzahl Bakterien, die aus den betroffenen Vierteln isoliert werden können (WENZ et al., 2006). *S. aureus* benötigt länger, um eine Mastitis auszulösen, welche zudem keine oder nur geringe systemische Krankheitssymptome beim Wirt hervorruft (PETZL et al., 2008).

### *Erregererkennung und Toll-Like-Rezeptor-Kaskade*

Es gibt 13 beschriebene TLR. Manche besitzen extrazelluläre Regionen und können bakterielle Liganden binden, wie der TLR-2 die Lipopeptide grampositiver Erreger und der TLR-4 das Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien (AKIRA & TAKEDA, 2004). Hitzeinaktivierte *E. coli* und *S. aureus* zeigten die Aktivierung von TLR-2 und TLR-4 (YANG et al., 2008).

Nach einem Kontakt von MEC mit *S. aureus* oder *E. coli* kann es zu einer höheren Genexpression besagter Toll-like-Rezeptoren kommen. Dies bedeutet aber nicht zwingend eine „stärkere“ Immunabwehr gegen den Erreger (YANG et al., 2008). Bei einer experimentellen Mastitis *in vivo* mit *E. coli* führte ein Erregerkontakt zu einer Hochregulation von TLR-2 und TLR-4 in den MEC des infizierten Viertels, im Gegensatz zum nicht inokulierten Kontrollviertel. Eine experimentelle Infektion mit *S. aureus* hingegen zeigte in den ersten 24 h nach Infektion keine Änderung der Genexpression von TLR-2 und TLR-4 (PETZL et al., 2008).

PMN gelten als erste zelluläre Effektoren bei der Immunantwort im Euter. Sie werden von *CXCL8* (IL-8), *CXCL1*, *CXCL2* und *CXCL3* zum Ort der Entzündung gelockt. Diese Zytokine werden sowohl nach Kontakt mit *E. coli* als auch mit *S. aureus* von den MEC und vermutlich auch den alveolaren Makrophagen produziert (GUNTHER et al., 2011).

Vitale *E. coli* verursachen im Vergleich zu hitzeinaktivierten Bakterien und LPS eine stärkere Immunantwort. Dieses Phänomen ist auf sogenannte „vitale Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ (PAMPs) zurückzuführen, die nur bei vitalen Bakterien präsent sind (SANDER et al., 2011).

### 1.3. Therapie- und Prophylaxekonzepte

Die Mastitis des Rindes ist eine multifaktorielle Krankheit. Deswegen sollte der Schwerpunkt bei der Bekämpfung dieser Erkrankung auf die Prävention gelegt werden. Bei einer bestehenden Mastitis sollte eine Therapieentscheidung von ökonomischen, hygienischen und Tierwohl Faktoren abhängig gemacht werden.

#### *Mastitistherapie*

Die Mastitis beim Rind kann unterschiedlich behandelt werden. Einen Einfluss haben verursachender Erreger, Krankheitsgrad oder Erkrankungshäufigkeit. In der Regel wird die erkrankte Kuh mit Antibiotika therapiert, welche abhängig von der Therapie sowohl lokal ins Euter als auch systemisch appliziert werden können (GOMES & HENRIQUES, 2016). Beim Vorliegen klinischer Mastitiden mit Störungen des Allgemeinbefindens werden immer häufiger routinemäßig nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) und Flüssigkeitstherapie eingesetzt (KROMKER & LEIMBACH, 2017).

Für die gezielte Mastitistherapie ist eine mikrobiologische Untersuchung von Viertelgemelksproben unerlässlich, da die Erfolgsaussichten der Therapie stark vom nachgewiesenen Pathogen abhängig sind (KROMKER & LEIMBACH, 2017).

Von den gramnegativen Bakterien ist *E. coli* der am häufigsten isolierte Erreger bei der klinischen Mastitis. Die Mastitiden treten oft am Anfang der Laktation auf und zeigen nicht nur lokale, sondern oftmals schwere systemische Symptome und können lebensgefährlich für die Kuh sein (BURVENICH et al., 2003).

Die Therapie von Mastitiden mittels Antibiotika ist nicht immer erfolgreich oder erforderlich. Bei Erregern wie *E. coli* ist unter anderem wegen der Resistenzen des Bakteriums gegen verschiedene Antibiotika eine antibiotische Therapie nicht immer erfolgreich (HINTHONG et al., 2017). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass unabhängig davon, ob eine *E.-coli*-Mastitis antibiotisch behandelt wird oder nicht, kein Unterschied hinsichtlich der Ausheilungsrate bestand (KROMKER & LEIMBACH, 2017). Bei *S. aureus* versagt meistens die antibiotische Therapie, obwohl der Erreger gegen die meisten eingesetzten Wirkstoffe sensibel ist. *S. aureus* kapselt sich aber im Euter ab und ist in der Lage einen Biofilm zu bilden, sodass die applizierten Antibiotika nicht wirken können (COSTERTON et al.,

1999).

Ziel jeder Therapie sollte neben der Bekämpfung des Erregers auch die Minimierung des Antibiotikaeinsatzes sein. Bei klinischen Mastitiden, beim selektiven Trockenstellen und bei hochgradigen Schmerzen und Leiden des erkrankten Tieres sind Antibiotika anzuwenden, in anderen Fällen sollten Alternativen gesucht werden. Durch gezielten Einsatz von Antibiotika bei klinischen Mastitiden nach Erregerbestimmung kann z.B. der Antibiotikaeinsatz minimiert werden (MCDOUGALL et al., 2018). Sogenannte Reserveantibiotika (Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Fluorchinolone) sollten nur angewendet werden, wenn es keine anderen therapeutisch wirksamen Alternativen gibt (KROMKER & LEIMBACH, 2017).

Eine Vielzahl an Alternativen zur Antibiotika-Therapie wurde im Laufe der Zeit entwickelt und getestet, z.B. *Propionibacterium acnes*, Ginseng-Saponin, Kräutergel, Propolis, Lysosubtilin, Chitosan und ein Lysozym-Dimer. Keine dieser Ansätze erwies sich jedoch als effektiver verglichen mit einem Antibiotikum (MALINOWSKI, 2002). Hinsichtlich Kosteneffektivität und Wirksamkeit gibt es somit derzeit keine Alternativen zu Antiinfektiva (TREVISI et al., 2014).

Aktuelle Forschungsansätze fokussieren sich zunehmend auf die Aktivierung des Immunsystems. So werden derzeit sowohl pathogenspezifische Vakzine (SCHUKKEN et al., 2014; COLLADO et al., 2018) als auch unspezifische Immunmodulatoren (VAN SCHYNDEL et al., 2018) zur Verbesserung der Eutergesundheit eingesetzt. Weiterhin bietet die Steigerung endogener antimikrobieller Substanzen, wie z.B. der  $\beta$ -Defensine eine vielversprechende Alternative.

### *Mastitisprävention*

In vielen Herden werden nach wie vor alle Euterviertel routinemäßig unter antibiotischem Schutz am Ende der Laktation trockengestellt. Dies soll helfen, bestehende intramammäre Infektionen auszuheilen, aber auch die Neuinfektionsrate zu senken. Die derzeitige Entwicklung hinsichtlich der geforderten Antibiotika-Minimierung (MCDOUGALL et al., 2009) schreibt jedoch nur noch einen gezielten und selektiven Einsatz von antibiotischen Trockenstellern vor

(CAMERON et al., 2015). Eine dadurch immer wichtiger gewordene Präventionsmaßnahme ist die Verwendung von Zitzenversiegeln zu Beginn der Trockensteckphase. Ihre Effektivität variiert je nach Studie (LAVEN et al., 2014; BATES et al., 2016; GOLDER et al., 2016). In den meisten Fällen wird dabei Mastitiden durch sogenannte „major pathogens“ (*E. coli*, *S. aureus*, *Sc. uberis*) entgegengewirkt, ohne dass negative Auswirkungen beobachtet werden (MCDUGALL et al., 2009).

Immunmodulatoren werden eingesetzt, um die Abwehrfunktionen der Tiere zu fördern. Einer Studie zufolge konnte die Applikation von Immunmodulatoren (IL-2 und UV inaktivierter *Parapoxvirus ovis*) nicht nur das Immunsystem der Kuh fördern und stärken, sondern auch die Mastitisrate in einer Herde minimieren (TREVISI et al., 2014). In einer weiteren Studie war die Eutergesundheit nach IL-2-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert und es wurden keine negativen Auswirkungen festgestellt (ZECCONI et al., 2009). Den Granulozyten-Koloniestimulierende Faktor ist als kommerzielle Form für Rinder erhältlich. In einer Studie wurde dieses Zytokin bei Kühen nach der Kalbung appliziert. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wurde beobachtet, dass ein signifikant höherer Anteil an zirkulierenden PMN ins Euter wanderte. Dies könnte bedeuten, dass eine erhöhte Anzahl an PMN im Blut eine geeignete prophylaktische Methode gegen Mastitis in der frühen Laktation darstellen könnte (VAN SCHYNDEL et al., 2018).

Derzeit gibt es keine Impfstoffe, die eine Mastitis verhindern. Es existiert ein kommerzieller Impfstoff gegen *E. coli* (J5), welcher die Schwere und das Risiko einer Mastitis minimiert (GONZALEZ et al., 1989). Das Risiko, dass die Kuh stirbt oder vorzeitig geschlachtet werden muss, wird durch eine Impfung mit dem J5-Antigen signifikant verringert (WILSON et al., 2007).

Bezüglich einer *S. aureus*-Vakzine existieren mehrere Studien, in denen nur eine geringe Effektivität festgestellt wurde (LEITNER et al., 2003; PRENAFETA et al., 2010). MIDDLETON et al. (2006) konnten bei ungeimpften Tieren im Vergleich zu geimpften Tieren jedoch eine längere Dauer klinischer Mastitiden feststellen.

Weitere Studien widmeten sich der Zusammenstellung von Impfstoff und Adjuvans gegen Mastitis. Eine Vakzine gegen *S. aureus* mit Biofilmantigen war in der Lage die Multiplikation des Bakteriums zu minimieren (PRENAFETA et al., 2010).

Gegen *Sc. uberis* wurde kürzlich ein Impfstoff erstellt, der bei einer experimentellen Infektion mit *Sc. uberis* die klinische Ausprägung der Mastitis und die Ausscheidung von Bakterien in der Milch reduziert (COLLADO et al., 2018).

## **2. Epigenetische Mechanismen der Inflammationssteuerung**

Die Immunantwort während einer Mastitis ist ein sehr komplexer, fein konzentrierter Vorgang. Viele Reaktionskaskaden und -elemente spielen nach Kontakt mit einem Pathogen, seinen Bestandteilen, geschädigten Zellen und Botenstoffen eine Rolle. Die Forschung der letzten Jahre hat überdies immer mehr auch den Einfluss der Epigenetik auf immunologische Vorgänge untersucht.

Als Epigenetik werden genetische Veränderungen bezeichnet, die mitotisch oder meiotisch vererbbar sind (WADDINGTON, 2012). Die Sequenz der DNA wird dabei jedoch nicht verändert (WU & MORRIS, 2001). Das Chromatin wird geöffnet oder geschlossen, und damit wird die verstärkte oder verminderte Expression der betroffenen Gene gesteuert. Diese Änderungen werden durch Enzyme reguliert.

Manche Enzyme wie Histondeacetylasen (HDACs) sind dafür bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei manchen Tumoren in der Humanmedizin spielen (BOLDEN et al., 2006; BOJANG & RAMOS, 2014; HEGEDUS et al., 2017). Deshalb werden Hemmfaktoren für HDACs gesucht, um Tumoren entgegenzuwirken. Diese HDAC-Hemmer können Krebszellen, z.B. durch Apoptose, abtöten (BOLDEN et al., 2006). In Zellen der menschlichen Mundschleimhaut sind epigenetische Mechanismen an der Pathogenspezies-abhängigen induzierten Synthese von antimikrobiellen  $\beta$ -Defensinen beteiligt (YIN & CHUNG, 2011). Weitere Bedeutung bei Abwehrgeschehen zeigte sich in murinen Makrophagen, wo die Produktion von Zytokinen durch epigenetische Mechanismen nach wiederholtem LPS-Stimulus gehemmt wurde (MAGES et al., 2007).

### **2.1. Methylierung und Acetylierung von Histonen**

Die Veränderungen an der Chromatinstruktur wird durch Änderungen an den Nukleosomen bewirkt, indem enzymatisch an dem aminoterminalen Ende Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen stattfinden (BOLDEN et

al., 2006).

Bei der Acetylierung lagert sich eine Acetylgruppe an das Chromatin. Die Acetylierung von Histonen ist mit der Öffnung von Histonen und somit der Förderung von Transkription assoziiert. Umgekehrt führt das Entfernen spezifischer Acetylreste häufig zu einer Repression der Transkription (CAMPOS & REINBERG, 2009).

Die Methylierung ist die kovalente Übertragung einer Methylgruppe auf ein Cytosin eines CpG-Dinukleotids. Bei der Methylierung ist der Effekt je nach Lokalisation innerhalb der Histone unterschiedlich. Beim Lysin 9 des Histons H3 (z.B. H3K9me<sub>2</sub>; -me<sub>3</sub>) sowie am Lysin 27 (H3K27me<sub>2</sub>; -me<sub>3</sub>) ist eine Methylierung oft mit Hemmung der Transkription einhergehend, während eine Methylierung des Lysins 4 (H3K4me<sub>2</sub>; -me<sub>3</sub>) des Histons H3 häufig mit einer Steigerung der Transkription verbunden ist (KOOISTRA & HELIN, 2012).

In den letzten Jahren zeigte sich, dass eine Veränderung des Methylierungs- und Acetylierungsmusters von Histonen, insbesondere von H3, relativ häufig vorkommt. Diese Änderungen stellen einen hoch dynamischen, akuten Mechanismus zur Genregulation im Verlauf der Infektionsabwehr dar (JAYANI et al., 2010).

Die Regulation von Enzymen, welche gezielte epigenetische Änderungen verursachen, bietet die Möglichkeit die Immunantwort des Patienten zu modulieren. Es ist bekannt, dass es Pathogen-spezifische Routen der Immunantwort gibt, z.B. aktiviert *E. coli* (im Gegensatz zu *S. aureus*) sehr stark die Expression vieler Transkriptionsfaktoren in den bovinen MEC, unter anderem auch verschiedene histonmodifizierende Enzyme (GUNTHER et al., 2011).

### **2.2. Epigenetisch wirksame Immunmodulatoren**

In der Humanmedizin werden unterschiedliche Immunmodulatoren als Therapie eingesetzt, insbesondere bei chronischen Krankheiten und Tumoren. Hintergrund der Therapie ist es, die Zytokinsynthese mittels HDAC-Hemmer und Methyltransferasen zu minimieren (DINARELLO et al., 2011; BOJANG & RAMOS, 2014; KOKO et al., 2017).



### *Vitamin D<sub>3</sub>*

Das pleiotrope Hormon Vitamin D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol, VitD<sub>3</sub>) hat einen großen Einfluss auf den Metabolismus und die Physiologie des Körpers bei allen Säugetieren einschließlich des Rindes. Die Relevanz dieses Hormons, sowohl für das angeborene als auch das erworbene Immunsystem, wurde in den letzten Jahren zunehmend erkannt (O'BRIEN & JACKSON, 2012).

VitD<sub>3</sub> kann vom Organismus entweder über die Nahrung aufgenommen oder in der Haut unter dem Einfluss von UV-Strahlung produziert werden. Der Gehalt von VitD<sub>3</sub> in der Milch ist geringer als im Blut (GILL et al., 2016).

Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beim Rind werden durch VitD<sub>3</sub> beeinflusst. VitD<sub>3</sub> ist z.B. im Rahmen der TLR Kaskade beteiligt, die letztendlich zur Bekämpfung von Infektionen beiträgt (NELSON et al., 2012). Die aktive Form von VitD<sub>3</sub> wirkt *in vitro* bei einer Konzentration zwischen 50 und 200 nM gegen *S. aureus*. Bei dieser Konzentration wird die Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“ oder mRNA) Konzentration von TLR-2 beeinflusst und die Genexpression von *TNF* und *IL-1 $\beta$*  gehemmt. Bei einer Stimulation der MEC mit VitD<sub>3</sub>, ist die Produktion von inflammatorischen Faktoren nach Kontakt mit *S. aureus* niedriger. Zusätzlich wird die Fähigkeit von *S. aureus* zur Kolonisation in den mammären Zellen gehemmt. Deshalb wird postuliert, dass VitD<sub>3</sub> für die Mastitisbehandlung gegen *S. aureus* eingesetzt werden könnte (ALVA-MURILLO et al., 2014). Bei YUE et al. (2017) zeigte sich durch nicht aktives 25(OH)VitD<sub>3</sub> eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums von *S. aureus* in MEC, welche nach Zusatz der aktiven Form (1,25(OH)VitD<sub>3</sub>) nicht festgestellt wurde.

In einer Studie von LIPPOLIS et al. (2011) wurden Kühe mit VitD<sub>3</sub> parenteral behandelt und mit *Sc. uberis* intramammär infiziert. Die Milchproduktion der zwei Versuchsgruppen (Behandlung mit VitD<sub>3</sub> bzw. Kontrollgruppe) zeigte geringe Unterschiede. Bei den mit VitD<sub>3</sub> behandelten Tieren war der Milchverlust nicht so abrupt, die Keimzahl in der Milch war geringer und die Mastitis nicht so stark ausgeprägt. Die Behandlung reichte jedoch nicht aus, um die Infektion vollständig zu bekämpfen (LIPPOLIS et al., 2011).

### SAHA

Die Histon-Deacetylase SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat) ist ein Derivat des Trichostatins. Seine hauptsächliche Funktion ist die Hemmung der HADCs (BOLDEN et al., 2006). Die Anwendung von SAHA bei Tumorpatienten wurde in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) im Jahre 2006 bewilligt. Bei Patienten nach Knochenmarktransplantationen führt SAHA im Körper zu einer Minderung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 und Interferon- $\gamma$  (REDDY, 2013).

Das Potenzial von SAHA für Therapie und Prophylaxe in der Tiermedizin ist hoch. Durch seine epigenetischen Veränderungen werden Proteinfunktionen und das Immunsystem beeinflusst, z.B. durch eine verminderte Produktion von Zytokinen. In einem *in vitro* Model mit Fibroblasten von Hunden zeigte sich der Zusatz von SAHA als effektiver Hemmer der Myofibroblastenproduktion. Durch die antiinflammatorische Aktivität von SAHA könnte so eine Fibrose vermieden werden (BOSIACK et al., 2012).

### S2101

S2101 ist einer der stärksten bekannten LSD-1 Hemmer und induziert sowohl Methylierungen als auch Demethylierungen. Deshalb sind Substanzen, die dieses Enzym regulieren können in der Lage, epigenetische Änderungen hervorzurufen (KONOVALOV & GARCIA-BASSETS, 2013). In der Region H3K4 kommt es bei hohen Konzentrationen von S2101 häufiger zu Methylierungen und es finden seltener Demethylierungen statt (MIMASU et al., 2010). Zusätzlich wird das Enzym KMD1A moduliert (BOJANG & RAMOS, 2014).

Bei der Kultivierung von humanen Tumorzellen mit S2101 konnte man keinen Effekt hinsichtlich epigenetischer Veränderungen von H3K4me<sub>2</sub> feststellen. Die Genexpression der Tumorzellen wird von S2101 beeinflusst. Es konnte nachgewiesen werden, dass Methylierungen stattfinden. Zusammenfassend ist S2101 für die Kombinierte Therapie bei Brust- und Kolonkrebs geeignet (SATO et al., 2017).

### 2.3. Epigenetische Inflamationssteuerung beim Rind

Beim Rind ist noch wenig über epigenetische Vorgänge bekannt, aber dieses Gebiet rückt zunehmend in den Fokus der Forschung. Epigenetische Mechanismen sind z.B. essenziell für die Pathogen-spezifische Regulation und Expression von  $\beta$ -Defensinen im Euter (LIU et al., 2011).

Die epigenetische Regulation beim Rind beginnt bereits in den frühen Phasen der Embryogenese. Diese Programmierung trägt zur wichtigen späteren Ausprägung des Phänotyps der adulten Rinder bei (GONZALEZ-RECIO et al., 2012). Auch in der Reproduktionstechnologie kommen die epigenetischen Einflüsse zum Tragen und werden derzeit umfangreich erforscht (URREGO et al., 2014; SMITH et al., 2015). Die bovinen Embryonen unterliegen während der Entwicklung im Uterus einer Vielzahl von epigenetischen Reprogrammierungen (DOBBS et al., 2013).

In einer Studie von CHANG et al. (2015) wurden Kühe mit einer energiereichen Ration gefüttert. In der Leber wurden inflammatorische Gene durch epigenetisch vermittelte Mechanismen hochreguliert. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Fütterung einer energiereichen Ration die Immunantwort der Kuh durch Steigerung der hepatischen Immungenexpression anhand höherer LPS-Konzentrationen gestärkt werden konnte.

Zur Epigenetik im Bereich des Euters gibt es aktuell mehrere Forschungsgebiete. Rinder besitzen eigene Immunelemente, welche eine wichtige Rolle bei der Abwehr spielen und durch epigenetische Mechanismen regulierbar sind. Z.B. werden Defensine, wie das LAP, im Euter von Kühen exprimiert und als ein Marker für Mastitis verwendet (GURAO et al., 2017). Die Genexpression von Milchproteinen wird auch durch epigenetische Mechanismen reguliert. Sowohl bei Mastitiden durch *E. coli* (VANSELOW et al., 2006) als auch durch *Sc. uberis* (SWANSON et al., 2009) kommt es zu einer ansteigenden DNA-Methylierung im Promoter des  $\alpha$ S1-Kasein-Gens und einer engeren Chromatindichte. Daraus resultiert eine starke Hemmung der Expression des Kaseinproteingens.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass *E. coli* und *S. aureus* nach Kontakt mit MEC im Euter verschiedene Histonmodifikationen verursachen, die schlussendlich zu einer Expressionsveränderung pro- und antiinflammatorischer

Gene führen (MODAK et al., 2012; MODAK et al., 2014; GUNTHER et al., 2017b). GUNTHER et al. (2017b) zeigte zudem eine Verbindung zwischen Epigenetik und Endotoxintoleranz in MEC. PETZL et al. (2012) zeigten auf, dass eine Euterinfektion mit *E. coli* in einem Euterviertel dazu führt, dass nachfolgende Infektionen in benachbarten Vierteln weniger stark zu klinischen Entzündungssymptomen führten. Zugrunde liegt das Phänomen der Endotoxintoleranz. Man versteht darunter, dass an der Abwehr beteiligte Zellen auf die wiederholte Gabe von mikrobiellen Bestandteilen in geringerem Maße reagieren, als auf die erste Gabe. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit nicht abschließend geklärt, dominiert wird das Geschehen jedoch über die Herabregulation TLR-assoziiierter Signalkaskaden. Diese Minderung in der Immunantwort durch Endotoxintoleranz konnte auch auf Molekularebene nachgewiesen werden (MAGES et al., 2007; GUNTHER et al., 2012). Verantwortlich sind vermutlich vorwiegend Veränderungen in der Chromatinstruktur, die selektiv zur Herabregulation inflammatorischer Faktoren führt (FOSTER et al., 2007). Neben der Wirt-schützenden Dämpfung einer überschießenden Entzündung gibt es jedoch auch eine Reihe antimikrobieller Faktoren, die nicht dieser Toleranz unterliegen, sondern im Gegenzug eine zunehmend gesteigerte Expression erfahren. Dies macht diesen Mechanismus sehr interessant für Ansätze einer vorübergehenden Mastitisprophylaxe.

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Geräte**

##### **1.1. Geräte für intrazelluläre Immunfluoreszenz**

|   |  |
|---|--|
| Automatisches Hämatologiegerät „Sysmex pocH-100iV Diff“ | (Sysmex Corporation, Kobe, Japan)            |
| Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Model Accuri C6        | (BD Bioscience, Heidelberg)                  |
| Gefriertruhe „Iridium 800 V-4-STD“                      | (Angelantoni Industrie S.r.l, Massa Martana) |
| Kühlschrank „Premium“                                   | (Liebherr, Ochsenhausen)                     |
| Laborwage PLJ 360-3M                                    | (KERN & SOHN, Balingen)                      |
| Minishaker „MS 1“                                       | (IKA, Staufen)                               |
| Rüttler für Mikrotiterplatten „MTS 4“                   | (IKA, Staufen)                               |
| Schüttler „Vortex ZX3“                                  | (VelpScientifica, Usmate, Italien)           |
| Tischzentrifuge „Universal 32 R“                        | (Hettich, Tuttlingen)                        |
| Wasserbad WBU45   | (Mettmert, Schwabach)                        |
| Zellzahlmessgerät „Cellcounter DCC“                     | (Tumba, Schweden)                            |

## **1.2. Geräte für die Kultivierung von Gewebeexplants**

|   |   |
|---|---|
| Autoklav „D-65“                               | (Systec, Linden)                              |
| Automatisches Koloniezählgerät „Flash & Grow“ | (IUL Instruments,<br>Königswinter)            |
| Bard®Magnum®Biopsy Instrument                 | (Murray Hill.,<br>Covington, USA)             |
| Brutschrank „HeracellVios 160“                | (Thermo Scientific,<br>Waltham, USA)          |
| Brutschrank „Incucell“                        | (MMM Medcenter,<br>Planegg)                   |
| Bunsenbrenner „Gasprofi 2SCS“                 | (WLD-TEC,<br>Göttingen)                       |
| CLARIOstar, Photometer                        | (BMG Labtech,<br>Ortenberg)                   |
| Eismaschine Model RF2266A                     | (The Manitowoc<br>Company,<br>Manitowoc, USA) |
| Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)           | (Einzelhandel)                                |
| Mini-Membran-Vakuumpumpe und Kompressoren     | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)                 |
| Schüttler „Vortex Genius 3“                   | (IKA, Staufen)                                |
| Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“        | (Kojair, Vilppula,<br>Finnland)               |

## **1.3. Geräte für molekularbiologische Untersuchungen**

|  |                    |
|--|--------------------|
| Biofuge „pico“                             | (Heraeus, Hanau)   |
| Experion Automated Electrophoresis Station | (Bio Rad, München) |

|                                  |                             |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Experion Priming Station         | (Bio Rad, München)          |
| Experion Vortex Station          | (Bio Rad, München)          |
| Nanophotometer Pearl             | (MIDSCI, USA)               |
| Professional Thermocycler        | (Biometra,<br>Göttingen)    |
| Reinigungsbox DNA RNA UV Cleaner | (Biosan, Lettland)          |
| Thermoshaker „BioShake IQ“       | (Analytik Jena,<br>Schweiz) |
| Vortex MS1 Minishaker            | (IKA, Staufen)              |
| Zentrifuge „My Fuge Mini“        | (Biozym, Oldendorf)         |
| Zentrifuge „Speed Mill Plus“     | (Analytik Jena,<br>Schweiz) |

## 2. Material

### 2.1. Laborbedarf für intrazelluläre Immunfluoreszenz

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| Cellstar® 96-Well-Platte, U Boden  | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim) |
| Einmal Untersuchungshandschuhe „Nitril Next Gen“                                 | (Meditrade,<br>Kiefersfelden) |
| Laborglasflaschen 100, 200, 500, 1000 mL   | (Duran Group,<br>Wertheim)    |
| Mikroschraubröhre 2 mL   | (Sarstedt,<br>Nümbrecht)      |
| Pipetten, einstellbar (0,5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1.000 µL und 1-5 mL) | (Sartorius,<br>Göttingen)     |
| Pipettierhilfe „accu-jet®“   | (Brand, Wertheim)             |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| Pipettenspitzen für Transferpettor® 10-50 µL        | (Brand, Wertheim)         |
| Pipettenspitzen Multiflex®-Tips, 0,5-200 µL         | (Carl Roth,<br>Karlsruhe) |
| Transferpette® 0,5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL    | (Brand, Wertheim)         |
| Transferpettor® Kapillar-Kolbenhubpipette, 10-50 µL | (Brand, Wertheim)         |
| Zentrifugenröhrchen 15 und 50 mL                    | (VRW, USA)                |

## **2.2. Klinikbedarf**

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| Polystyrol-Röhrchen (steril), 13 mL     | (Sarstedt,<br>Nümbrecht)         |
| CMT-Test Lösung Bovivet                 | (Kruuse, Denmark)                |
| CMT-Testschale                          | (Bayer, Leverkusen)              |
| Einmalskalpell Nr. 22                   | (Braun, Kronberg im<br>Taunus)   |
| Fine-Ject Kanülen, 14G x 2 ½"           | (Henke Sass Wolf,<br>Tuttlingen) |
| Microlance™ Kanülen 3,18 G 1 ½"         | (BD Bioscience,<br>Heidelberg)   |
| Monovette® EDTA KE/9 mL                 | (Sarstedt,<br>Nümbrecht)         |
| Venenverweilkanüle 16 G 1,7 x 50 mm FEP | (B. Braun,<br>Melsungen)         |

## **2.3. Laborbedarf für die Kultivierung von Gewebeexplants**

|                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
| Chemotaxiskammer, 10-Well   | (NeuroProbe Inc.,<br>USA) |
| Gewebekulturplatte, 24-Well | (Sigma,-Aldrich,          |



|  |                                |
|--|--------------------------------|
|  | Steinheim)                     |
| Mikroschraubröhrchen, <i>freestanding</i> 0,5 mL                                       | (VWR, USA)                     |
| Parafilm „M“/Pechiney  | (Bemis, USA)                   |
| Petrischale, Glas  | (Carl Roth,<br>Karlsruhe)      |
| Pinzette, anatomisch   | (Carl Roth,<br>Karlsruhe)      |
| Pinzette, chirurgisch  | (Aesculap,<br>Tuttlingen)      |
| Polycarbonatfilter, 3 µm Pore, 25 x 80mm   | (NeuroProbe Inc.,<br>USA)      |
| Serumpipetten 5, 10 und 25 mL  | (VWR, USA)                     |
| RNAlater <sup>®</sup>  | (Sigma,-Aldrich,<br>Steinheim) |
| Skalpellhalter   | (Carl Roth,<br>Karlsruhe)      |
| Skalpellklingen Typ 15   | (Carl Roth,<br>Karlsruhe)      |
| Transmigrationskammer, 10-Well mit Polycarbonat-<br>membran 25 x80 mm, Porengröße 3 µm | (NeuroProbe Inc.,<br>USA)      |

#### 2.4. Laborbedarf und Reagenzien für Bakteriologie

|                            |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|
| Brain Heart Infusion Broth | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)   |
| Columbia-Schafblut-Agar    | (Oxoid, Wesel)                  |
| Cryobank™ Tubes            | (Mast Diagnostica,<br>Reinfeld) |

|   |   |
|---|---|
| <i>E. coli</i> Stamm 1303                     | (Stiftung<br>Tierärztliche<br>Hochschule<br>Hannover) |
| Edwards-Agar mit Schafblut (mod.)             | (Oxoid, Wesel)  |
| Impföse aus Edelstahl                         | (Carl Roth, Belgien)                                  |
| Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar) | (Oxoid, Wesel)  |
| <i>S. aureus</i> Stamm 1027                   | (Stiftung<br>Tierärztliche<br>Hochschule<br>Hannover) |
| Tryptic Soy Broth                             | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)                         |

## 2.5. Laborbedarf für das Testverfahren „AlphaLISA®“

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| 384-Well-Platte                 | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |
| Abdichtungsfolie für AlphaLISA® | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |

## 2.6. Laborbedarf für molekularbiologische Untersuchungen

|   |  |
|---|--|
| 96-Well-Platte                                    | (4titude, UK)                              |
| Abdichtungsfolie für PCR-Platten                  | (4titude, UK)                              |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße Rnase/Dnase frei 0,2 mL | (Biozym Scientific,<br>Hessisch Oldendorf) |
| innuSPEED Lysetubes „P“                           | (Analytik Jena AG,<br>Schweiz)             |
| Pinzette, anatomisch, gerade, spitz               | (Carl Roth, Belgien)                       |
| Pipettenspitzen 1 µL                              | (Brand, Wertheim)                          |

|   |  |
|---|--|
| Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µL                  | (Biozym Scientific,<br>Hessisch Oldendorf) |
| Transferpette® 0,1-1, 0,5-10, 20-200, 100-1000 µL | (Brand, Wertheim)                          |
| Verschlusszylinder PCR Soft Tubes, 0,5 mL         | (Biozym Scientific,<br>Hessisch Oldendorf) |

## 2.7. Reagenzien für intrazelluläre Immunfluoreszenz

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Albumin fraction V (Bovines Serum Albumin, BSA)                           | (Merk, Darmstadt)                    |
| Clean solution FACS   | (BD Bioscience,<br>Heidelberg)       |
| Dimethylsulfoxide ( $\geq 99,5\%$ )                                       | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)        |
| Esel anti Kaninchen IgG (H+L) FITC markiert                               | (Jackson<br>Immunoresearch,<br>UK)   |
| Kaninchen Anti-Histon H3 (acetyl K9) Antikörper IgG (H3K9ac)              | (Abcam, UK)                          |
| Maus IgG (Negativkontrolle, ISO M)  | (Bio-Rad<br>AbDSerotec,<br>Puchheim) |
| Maus Anti-Histone (methyl K4) Antikörper (H3K4me <sub>3</sub> )           | (Abcam, UK)                          |
| Maus Anti-Histone (methyl K27) Antikörper (H3K27me <sub>3</sub> )         | (Abcam, UK)                          |
| Paraformaldehyd, Pulver   | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)        |
| Polyklonaler Kaninchen anti Huhn IgY Antikörper negativ Kontrolle (ISO R) | (YO Proteins,<br>Sweden)             |
| Saponin („quillaja bark“) $\geq 10\%$                                     | (Sigma-Aldrich,                      |

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
|  | Steinheim)                         |
| Ziege anti Maus IgG Antikörper PE markiert                                 | (Biozol, Eching)                   |
| <b>2.8. Reagenzien für die Explantkultur</b>                               |                                    |
| 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>                            | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Biocoll Trennlösung  | (Merk Biochrom, Berlin)            |
| Bovine serum low in endotoxin  | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Colorimetric cell viability kit II, WST-1                                  | (Promokine, Heidelberg)            |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture<br>F-12 Ham (DMEM-F12) | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Easycoll Trennlösung   | (Merk Biochrome, Berlin)           |
| Fetales Kälber Serum (FCS)   | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Fluo-4 AM  | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Hakenpinzette 14,5cm 1:2 Zähne   | (Hauptner-Herberholz,<br>Solingen) |
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)                                       | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Hydrocortison  | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Insulin aus Rinderpankreas   | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim)      |
| Rekombinantes Interleukin 8, human (rhIL-8)                                | (Petrotek, USA)                    |
| Ionomycin -Kalziumsalz ( <i>Streptomyces conglatobus</i> )                 | (Sigma-Aldrich,                    |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
|  | Steinheim)                    |
| Lipopolysaccharide von <i>E. coli</i>          | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim) |
| LSD1 Inhibitor II (S2101)                      | (Calbiochem, Darmstadt)       |
| Natriumazid ( $\geq 99,5\%$ )                  | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim) |
| Paraformaldehyd Pulver, 95 %                   | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim) |
| PBS Dulbecco                                   | (Biochrom, Berlin)            |
| Percoll Trennlösung                            | (Merk Biochrom, Berlin)       |
| Propidiumjodid (PI)                            | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim) |
| Vorinostat (SAHA)                              | (Sigma-Aldrich,<br>Steinheim) |
| Water soluble tetrazolium salts 1 (WST-1) Test | (Interchim, Österreich)       |

## 2.9. Reagenzien für das Testverfahren „AlphaLISA®“

|  |                          |
|--|--------------------------|
| AlphaLISA® anti bIL-1 $\beta$ , bIL-8, bIL-10 und bTNF $\alpha$ acceptor beads | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |
| AlphaLISA® Immunassay Puffer   | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |
| Biotinylated anti bIL-1 $\beta$ , bIL-8, bIL-10 und bTNF $\alpha$ antibody     | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |
| Bovines IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 und TNF $\alpha$ Analyt                     | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |
| Streptavidin (SA)-coated donor beads   | (PerkinElmer,<br>Rodgau) |

## **2.10. Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen**

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Deoxynucleotide Triphosphat (dNTPs)                          | (Promega,<br>Mannheim)    |
| M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus, Point Mutant (RT) | (Promega,<br>Mannheim)    |
| Oligo dT 15 Primer   | (Promega,<br>Mannheim)    |
| SensiFAST™ SYBR® No Rox Kit                                  | (Bioline,<br>Luckenwalde) |
| RNA Mini Kit   | (Bio&Sell, Feucht)        |
| RNase und DNase-freies Wasser                                | (Carl Roth, Belgien)      |
| RNasin Ribonuclease Inhibitor                                | (Promega,<br>Mannheim)    |

## **2.11. Kulturmedien, Puffer und Lösungen**

Alle verwendeten Stoffe, die lyophilisiert oder als Pulver vorlagen, wurden nach Herstellerangaben aufbereitet und gelagert.

### **2.11.1. Lösungen, Puffer und Antikörper für intrazelluläre Immunfluoreszenz**

#### *MIF-Puffer*

- 500 mL Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; III 2.11.3)
- 2,5 g Albumin Fraktion V (BSA)
- 500 µL Natriumazid

Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

#### *Saponinpuffer*

- 100 mL MIF-Puffer
- 0,5 g Saponin („quillaja bark“)  $\geq 10$  %

Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Unverbrauchter Puffer wurde nach

acht Wochen Lagerung verworfen.

*1 %iges Paraformaldehyd (PFA)*

- 1 g Paraformaldehyd
- 100 mL PBS

Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

*10 %ige DMSO Lösung*

- 5 mL Dimethylsulfoxide (DMSO)
- 50 mL PBS

*IgY ISO R (0,5 mg/mL)*

- 250 µL Stocklösung des Antikörpers (AK) (1 mg/mL)
- 250 µL PBS

Jeweils 10 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*IgG ISO M (0,1 mg/mL)*

Es erfolgte keine Vorverdünnung. Jeweils 10 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*IgG H3K9ac (0,1 mg/mL)*

- 100 µg Stocklösung des AK (1 mg/mL)
- 900 µL PBS

Jeweils 20 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*IgG H3K4me<sub>3</sub> (0,1 mg/mL)*

- 100 µg Stocklösung des AK (1 mg/mL)
- 900 µL PBS

Jeweils 10 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*IgG H3K27me<sub>3</sub> (0,1 mg/mL)*

- 100 µg Stocklösung des AK (1 mg/mL)
- 900 µL PBS

Jeweils 10 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*IgG-FITC (0,12 mg/mL)*

- 0,3 mg des AK wurden in 250 µL *Aqua destillata* (*Aqua. dest.*) aufgelöst (1,2 mg/mL)
- 100 µL Stocklösung (1,2 mg/mL)
- 900 µL PBS

Jeweils 10 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*IgG-PE (0,1 mg/mL)*

- 100 µL Stocklösung des AK (1 mg/mL)
- 900 µL PBS

Jeweils 10 µL wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **2.11.2. Kulturmedien und Zusätze**

*Medium für die Inkubation von Gewebe-Explants („Eutermium“)*

- 100 mL DMEM-F12
- 200 µL Insulin (5 mg/mL) (Endkonzentration: 10 µg/mL)
- 50 µL Hydrocortison (1 mg/mL) (Endkonzentration: 0,5 µg/mL)
- 1 mL Antibiotic-Antimycotic (APS)

Endkonzentration:

100 µg/mL Penicillin G

100 µg/mL Streptomycin

2,5 µg/mL Amphotericin B

Das Medium wurde in 50 mL Röhrchen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.



*VitD3 (10 µg/mL)*

- 10 µg VitD<sub>3</sub>
- 1000 µL Ethanol 70 %

Die Lagerung erfolgte in einem Kryoröhrchen und wurde bei -20°C eingefroren.

*SAHA (2,5 mg/mL)*

- 25 mg SAHA
- 10 mL 10 %iges DMSO

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

*S2101 (1 mg/mL)*

- 5 mg S2101
- 5 mL 10 %iges DMSO

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

*Fluo-4*

- 50 µg Fluo 4
- 5 µL 10 %iges DMSO

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

*Ionomycin (1 mg/mL):*

- 1 mg Ionomycin
- 1 mL 10 %iges DMSO

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **2.11.3. Material für die Separation von Zellen**

*Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)*

Die Bestandteile lagen in den folgenden Konzentrationen vor:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 8,0 g  |
| KCl                              | 1,24 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,2 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,2 g  |

*Aqua dest.* ad 1.000 mL

Die PBS-Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* gelöst und für den Gewebetransport (III.3.3.3) sterilisiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

Doppelt konzentrierte PBS (2 x PBS) wurde in zweifacher Konzentration nach Herstellerangaben angesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

#### **2.11.4. Lösungen für die Durchflusszytometrie**

Zur Reinigung des Durchflusszytometers wurde das Messkanalsystem nach jeder Messung mit sterilem filtrierten *Aqua dest.* und FACS Clean (2.7) gespült.

#### **2.11.5. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Untersuchungen**

*Master Mix cDNA Synthese* (für eine Probe):

- 5 µL Puffer
- 1,25 µL dNTP
- 0,5 µL RT
- 0,625 µL RNasin
- 14 µL RNA/DNA freies Wasser

*Master Mix für PCR* (für eine Probe):

- 10 µL SYBR green® PCR Master Mix
- 0,8 µL Primer forward (5 µmol/L)
- 0,8 µL Primer reverse (5 µmol/L)
- 7,4 µL DNase-RNase freies Wasser

#### **2.12. Primer**

Für die fünf verschiedenen Gene, die analysiert wurden, wurden folgende *forward* und *reverse* Primer verwendet (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Primer Sequenz**

| Gen           | Vorwärts- (for) und Rückwärts- (rev) Primer (5' → 3') und Konzentrationen (nmol/L) | Länge des Amplikons | Referenz                                  |
|---------------|--|---------------------|---|
| <i>TNF</i>    | for CTTCTGCCTGCTGCACTTCG (20)<br>rev GAGTTGATGTCGGCTACAACG (22)                    | 156                 | (YANG et al., 2008)                       |
| <i>CXCL8</i>  | for CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA (23)<br>rev GGCCCACTCTCAATAACTCTC (20)                 | 170                 | (YANG et al., 2008)                       |
| <i>IL-10</i>  | for TGACTTTAAGGGTTACCTGGGTT (23)<br>rev GCTTCTCCCCAGTGAGTTC (20)                   | 130                 | novel design<br>Acc. No.:<br>NM_174088.1  |
| <i>LAP</i>    | for AGGCTCCACCTGCTCCTT(21)<br>rev AGCCCAAGTAAATGCTGCAGG(22)                        | 185                 | novel design<br>Acc. No.:<br>NM_203435.3  |
| <i>S100A9</i> | for GGCTAGGGCACTATGACAC (22)<br>rev GGCCACCAGCATAATGAAC (21)                       | 179                 | novel design<br>Acc. No.:<br>NM_001046328 |

for: forward Primer; rev: reverse Primer; Acc. No: Accession-Nummer der Nukleotid-Sequenz der NCBI Gen-Datenbank, welche für die Erzeugung der Primer benutzt wurde; nmol: nanomolar.

## 2.13. Versuchstiere

### 2.13.1. Spendertiere für die intrazelluläre Immunfluoreszenz

Um die Unterschiede im Acetylierungs- und Methylierungsmuster von PMN in Blut und Milch mittels einer ICIF-Färbung (III.3.2) zu untersuchen, wurden laktierende Kühe beprobt, die klinisch allgemein gesund waren aber auf mindestens einem Euterviertel eine subklinische Mastitis zeigten. Die Tiere waren im Lehr- u. Versuchsgut Oberschleißheim der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München aufgestellt. Einmal wöchentlich über drei Wochen wurde jeweils das Viertel mit der höchsten somatischen Zellzahl beprobt (Tabelle 2). Die regelmäßige Blutentnahme war durch den Tierversuchsauftrag Nr. Gz.: 55.2-1-54-2532.0-85-14 „Gewinnung von Blut beim Rind zu wissenschaftlichen Zwecken“ durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

**Tabelle 2: Blut- und Milch-Spendertiere für intrazelluläre Immunfluoreszenz**

| Tier-Nr. | Rasse | Laktation | Beprobtes Viertel | Zellzahl Woche 1 | Zellzahl Woche 2 | Zellzahl Woche 3 | BU (48 h)        |
|----------|-------|-----------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 123      | HF    | 4°        | HL                | 1.928.000        | 1.648.000        | 1.428.000        | Staph. spp.      |
| 151      | HF    | 3°        | VR                | 821.000          | 610.000          | 810.000          | <i>S. aureus</i> |
| 238      | HF    | 4°        | HL                | 429.000          | 3.154.000        | 5.350.000        | <i>E. coli</i>   |

HF = Holstein-Friesian; VR = vorne rechts; HL = hinten links; Zellzahl = Zellen pro mL; BU (48 h) = Bakteriologische Untersuchung, abgelesen nach 48 h.

### 2.13.2. Spendertiere für die Blutgewinnung

Die Kühe, deren Blut für die Isolierung von PMN gewonnen wurde (III.3.5.1 und III.3.6.1), waren Kreuzungstiere der Rasse Holstein-Friesian und Fleckvieh, nicht laktierend und hatten mindestens einmal gekalbt. Die Haltung erfolgte im Laufstall im Lehr- u. Versuchsgut Oberschleißheim der LMU München. Alle verwendeten Tiere waren klinisch gesund. Die regelmäßige Blutentnahme war durch den Tierversuchsantrag Nr. Gz.: 55.2-1-54-2532.0-85-14 „Gewinnung von Blut beim Rind zu wissenschaftlichen Zwecken“ durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden. Für den Chemotaxisassay (III.3.5) wurde immer dieselbe, sechs Jahre alte, trockenstehende Kuh verwendet (87 % Holstein-Friesian, 6 % Fleckvieh, 7 % Rest, drei Kalbungen). Sie war während des gesamten Versuchszeitraums klinisch gesund und die Blutwerte ihres roten Blutbilds lagen im Referenzbereich (Klinik für Wiederkäuer der LMU, Oberschleißheim). Die Kuh wurde maximal zwei Mal pro Woche beprobt.

### 2.13.3. Spendertiere für die Gewebegewinnung

Für die Gewinnung von Zitzen- und Eutergewebe für die Explantkultur (III.3.3.3) wurden laktierende Kühe nach Anlieferung auf einem Schlachthof nach definierten Kriterien (III.3.3.2) ausgewählt. Es handelte sich um Kühe unterschiedlicher Rassen. Detaillierte Angaben zu den Spendertieren finden sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3: Spendertiere für die Gewebebegewinnung**

| Tier-Nr. | Rasse | T°   | Sekret makro | CMT  | beprobtes Viertel | Zellzahl (Zellen/mL) | BU (48 h)  |
|----------|-------|------|--------------|--|-------------------|----------------------|--|
| 1        | HF    | 38,9 | obB          | VR: - - -<br>HR: (+) - -<br>VL:(+) - -<br>HL: + - -  | VR                | 72.000               | Milch: 4/4: negativ<br>Tupfer: negativ   |
| 2        | HF    | 38,2 | obB          | VR: + + -<br>HR: + + +<br>VL:(+) - -<br>HL: Tr.      | VL                | 213.000              | Milch: 3/3: negativ<br>Tupfer: negativ   |
| 5        | BV    | 38,6 | obB          | VR: + + -<br>HR: (+) - -<br>VL: + + +<br>HL: + + -   | HR                | 266.000              | Milch: VR, HL:<br><i>Staph. spp.</i> VL:<br><i>Proteus</i><br>Tupfer: negativ          |
| 6        | HF    | 38,5 | obB          | VR: (+) - -<br>HR: (+) - -<br>VL: Tr.<br>HL: - - -   | HL                | 62.000               | Milch: 4/4: negativ<br>Tupfer: negativ   |
| 7        | FV    | 38,3 | obB          | VR: (+) - -<br>HR: Tr.<br>VL: + + -<br>HL: Tr.       | VR                | 180.000              | Milch: VR: KNS<br>Tupfer: negativ  |
| 8        | BV    | 38,6 | obB          | VR: + - -<br>HR: (+) - -<br>VL: Tr.<br>HL: + + +     | HR                | 11.000               | Milch: HL:<br><i>Trueperella</i> .<br><i>pyogenes</i><br>Tupfer: negativ               |
| 9        | BV    | 39,2 | obB          | VR: + + -<br>HR: (+) - -<br>VL: + + -<br>HL: + + -   | HR                | 210.000              | Milch: VR, HL:<br>äsk. pos. Strep.<br>Tupfer: negativ                                  |
| 10       | BV    | 38,8 | obB          | VR: + + -<br>HR: + + -<br>VL: (+) - -<br>HL: + + -   | VL                | 149.000              | Milch: HR: äsk.<br>pos. Strep.<br>Tupfer: negativ                                      |
| 11       | FV    | 38,7 | obB          | VR: + + -<br>HR: + + -<br>VL: (+) - -<br>HL: + + -   | VL                | 240.000              | Milch: HL: äsk.<br>pos. Strep.<br>Tupfer: negativ                                      |
| 12       | HF    | 39,9 | obB          | VR: Tr.<br>HR: (+) - -<br>VL: (+) - -<br>HL: - - -   | HL                | 104.000              | Milch: HR: kont.<br>Mischflora. VL:<br>KNS. HL: äsk.<br>pos. Strep.<br>Tupfer: negativ |
| 13       | BV    | 38,4 | obB          | VR: (+) - -<br>HR: + - -<br>VL: (+) - -<br>HL: + + - | VL                | 151.000              | Milch: 4/4: negativ<br>Tupfer: negativ   |
| 14       | BV    | 38,7 | obB          | VR: (+) - -<br>HR: + + -<br>VL: + - -<br>HL: + + -   | VR                | 199.000              | Milch: 4/4: negativ<br>Tupfer: <i>Staph. spp</i>                                       |
| 15       | FV    | 38,1 | obB          | VR: (+) - -<br>HR: + - -<br>VL: - - -<br>HL: + + -   | VL                | 37.000               | Milch: VR: KNS<br>Tupfer: negativ  |

### III. Material und Methoden

| Tier-Nr. | Rasse | T°   | Sekret makro | CMT  | beprobtes Viertel | Zellzahl (Zellen/mL) | BU (48 h)   |
|----------|-------|------|--------------|--|-------------------|----------------------|---|
| 16       | BV    | 38,1 | obB          | VR: + - -<br>HR: Tr.<br>VL: (+) - -<br>HL: + + -   | VL                | 183.000              | Milch: 3/3: negativ<br>Tupfer: negativ            |
| 17       | BV    | 39,9 | obB          | VR: + + -<br>HR: (+) - -<br>VL: + + -<br>HL: + + - | HR                | 38.000               | Milch: HR: kont.<br>Mischflora<br>Tupfer: negativ |
| 18       | FV    | 39,0 | obB          | VR: + + -<br>HR: + + -<br>VL: (+) - -<br>HL: + + - | VL                | 28.000               | Milch: HR: kont.<br>Mischflora<br>Tupfer: negativ |
| 19       | BV    | 38,5 | obB          | VR: + + +<br>HR: + - -<br>VL: + - -<br>HL: + - -   | HR                | 192.000              | Milch: 4/4: negativ<br>Tupfer: negativ            |
| 20       | BV    | 38,5 | obB          | VR: + + -<br>HR: - - -<br>VL: + + -<br>HL: (+) - - | HR                | kD                   | Milch: 4/4: negativ<br>Tupfer: negativ            |
| 21       | FV    | 38,7 | obB          | VR: + + -<br>HR: - - -<br>VL: - - -<br>HL: - - -   | VL                | kD                   | Milch: 4/4: <i>Staph. spp.</i><br>Tupfer: negativ |
| 22       | FV    | 38,4 | obB          | VR: Tr.<br>HR: + - -<br>VL: (+) - -<br>HL: + (+) - | VL                | kD                   | Milch: 3/3: negativ<br>Tupfer: negativ            |

*BV = Braunvieh; FV = Fleckvieh; HF = Holstein-Friesian; T° = rektale Temperatur (in °C); Sekret makros. = makroskopische Beschaffenheit des Eutersekrets; CMT = California Mastitis Test; Tr. = trockenes Viertel; BU (48h) = Bakteriologische Untersuchung, abgelesen nach 48 h; äsk. pos. Strep. = Äskulin-positive Streptokokken; KNS = Koagulase Negative Staphylokokken; Staph. spp. = Staphylokokkus Spezies; kont. = kontaminierte Probe; obB = ohne besonderen Befund; VR = vorne rechts; HR = hinten rechts; VL = vorne links; HL = hinten links; CMT-Ergebnisse: - - -: negativ, (+) - -: zweifelhaft, + - -: schwach positiv, + + -: deutlich positiv, + + +: stark positiv; kD = keine Daten erhoben.*

### **3. METHODEN**

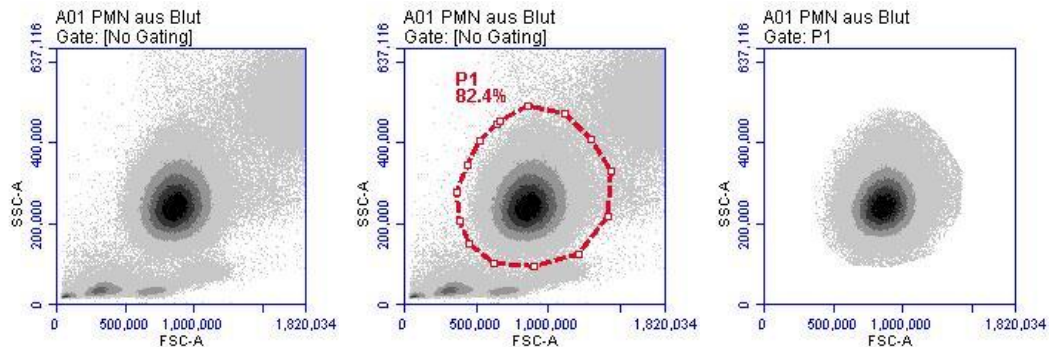
Die Blut- und Milchgewinnung erfolgte am Lehr- u. Versuchsgut Oberschleißheim der LMU München. Die Gewinnung von Explants aus Zitzen- und Eutergewebe erfolgte am Schlachthof A. Moxsel AG in Buchloe (86807). Die Laborarbeiten wurden im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München in Oberschleißheim durchgeführt. Die Räumlichkeiten für die mikrobiologischen Untersuchungen waren getrennt von denen für die Zell- und Gewebekultur und für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen.

#### **3.1. Durchflusszytometrie**

Durchflusszytometer sind apparative Plattformen, die mit sehr hoher Flexibilität die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen erlauben. Die Einzelzellen oder Partikel werden an einem Laserstrahl vorbei geleitet und das gestreute Licht einer speziellen Wellenlänge (hier 488 bzw. 640 nanometer [nm]) wird in Richtung des Strahls als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder im 90° Winkel dazu, als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), erfasst. Die Größe und der Refraktionsindex der Zellen und Partikel werden durch die Vorwärtsstreuung (FSC) charakterisiert. Durch die Seitwärtsstreuung (SSC) wird die Komplexität, das heißt die Granularität und die Oberflächenbeschaffenheit, gekennzeichnet. Die Signale werden erfasst und mit Hilfe des Computers und der dementsprechenden Software werden die Geräteeinstellungen kontrolliert, Messereignisse erfasst, bearbeitet und gespeichert (RADBRUCH, 2000). Die Auswertung der Daten erfolgte im FCS 3.0 Datenformat mit der Software FCS Express™ Version 1.0.264.21.

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer BD Accuri C6® (III.1.1) verfügt über zwei Laser, deren Wellenlänge bei 488 nm bzw. 640 nm liegen. Das Gerät erfasst mit entsprechenden Detektoren Fluoreszenzlicht-Emissionen in vier verschiedenen Wellenlängenbereichen (FL1 = Grünfluoreszenz: 515–545 nm; FL2 = Orangefluoreszenz: 564–606 nm; FL3 = Rotfluoreszenz: >670 nm; FL4 = 663–687 nm). Bei jeder Messung wurden pro Ereignis fünf Parameter (FSC, SSC, FL1, FL2 und FL3) erfasst und gespeichert. Diese Parameter wurden unterschiedlich kombiniert, so dass z.B. bestimmte Zellgruppen definiert werden konnten. Hierfür wurden elektronische Fenster (Gates) oder Quadranten gesetzt, an denen

die gemessenen Werte abgelesen werden konnten. Die Verknüpfung von mehreren Fenstern war ebenfalls möglich. Die einzelnen Ergebnisse wurden mit Punkten (Beads) repräsentiert, die als Histogramme oder Dichtediagramme dargestellt werden konnten (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Durchflusszytometrische Erfassung von PMN**

*Dargestellt als „density plot“ sind bovine Granulozyten nach Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut. Linkes Fenster: Gesamtereignisse im „forward scatter“ (FSC) gegen „side scatter“ (SSC). Mittleres Fenster: Identifizierung der Granulozyten (82,4 %), Region „P1“. Rechtes Fenster: Setzen eines „Gates“ nur auf Granulozyten.*

Spezifische Farbstoffe können verwendet werden, um definierte Zellen oder Partikel zu färben. Bei den dazu entsprechenden Kanälen (FL1, FL2 oder FL3) wird die Fluoreszenz gemessen und erfasst. Zu beachten ist auch, dass manche Zellen (z.B. eosinophile Granulozyten) eine eigene Fluoreszenz besitzen, die in bestimmten Kanälen aufgenommen wird.

In dieser Arbeit wurden drei Labormethoden benutzt und etabliert, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und ausgewertet werden konnten: die ICIF-Färbung (III.3.2), der funktionelle Chemotaxisassay (III.3.5) und die funktionelle Fluo-4 Färbung (III.3.6).

### 3.2. Intrazelluläre Immunfluoreszenz Färbung

Um Unterschiede im Acetylierungs- und Methylierungsmuster von PMN zu untersuchen, wurden diese Immunzellen aus Rinderblut und Milch isoliert, um danach eine spezifische intrazelluläre (ICIF) Färbung durchzuführen. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Beprobt wurden drei Tiere einmal wöchentlich über drei Wochen.



### 3.2.1. Gewinnung von Milch

Die Milch für die Untersuchungen stammte von drei Kühen (III.2.13.1), die klinisch gesund waren, aber eine subklinische Mastitis zeigten. Zuerst wurde das Sekret makroskopisch beurteilt und anschließend ein California Mastitis Test (CMT) durchgeführt. Hierfür wurde nach dem Verwerfen des Vorgemelks das Viertelanfangsgemelk ermolken, bis zur Markierungslinie von 2 mL abgekippt, anschließend zu gleichen Teilen mit der Testflüssigkeit versetzt und kreisförmig geschwenkt. Die Schlieren- bzw. Gelbildung wurde unverzüglich beurteilt und einer in der Tabelle 4 beschriebenen Kategorie zugeordnet. Für die bakteriologische Untersuchung (BU) wurden sterile Milchproben von allen vier Vierteln des jeweiligen Tieres zu jedem Untersuchungszeitpunkt gewonnen (III.3.2.3). Anschließend wurde ein 50 mL Röhrchen mit der Milch des ausgewählten Viertels gefüllt. Alle Milchproben wurden innerhalb der folgenden 15 min im Labor analysiert.

**Tabelle 4: Beurteilung des California-Mastitis-Tests (CMT) (modifiziert nach Rosenberger 1990 (ROSENBERGER, 1990))**

| Reaktion  | Beurteilung                  | Zellzahl               |
|---|------------------------------|------------------------|
| Die Probe bleibt flüssig, keine Kennzeichen einer Konsistenzveränderung oder Schlierenbildung   | Negativ<br>- - -             | 0 – 100.000            |
| Leichte Konsistenzveränderung bzw. leichte Schlierenbildung   | Zweifelhaft<br>(+) - -       | 50.000 –<br>500.000    |
| Verstärkte Schlierenbildung, aber noch keine Tendenz zur Gelbildung   | Schwach<br>positiv<br>+ - -  | 400.000 –<br>1.500.000 |
| Die Mischung verdickt sich augenblicklich, geringgradige Gelbildung. Bei kreisförmigen Bewegungen hat die Mischung die Tendenz, sich in der Mitte der Schalen anzusammeln, der Rand des Bodens in den Aufsätzen bleibt frei von dem Gemisch. Beim Aufhören der kreisförmigen Bewegungen verteilt sich die Mischung wieder gleichförmig. | Deutlich<br>positiv<br>+ + - | 800.000 –<br>5.000.000 |
| Starke Konsistenzänderung, Gelformung, die eine konvexe Oberfläche der Mischung bedingt. Nach Aufhören der Bewegung ballt sich das Gel kuppenförmig im Zentrum der Schale zusammen, der Boden der Testschale ist nicht mehr ganz bedeckt.   | Stark positiv<br>+ + +       | Über<br>5.000.000      |

### 3.2.2. Gewinnung von venösem Blut

Nach der Milchgewinnung folgte die Blutgewinnung aus der *Vena jugularis*. Die

Kühe wurden im Fressgitter gefangen, am Kopf fixiert, die Haut an der Drosselrinne mit 70 %igen Ethanol desinfiziert und die Vene mit einer Staukette nach Witte angestaut. Die Blutentnahme erfolgte mit einer sterilen Kanüle (14G). Das venöse Blut wurde in 9 mL EDTA Röhrchen aufgefangen.

Zusätzlich wurde Blut nach dem gleichen Verfahren von gesunden Kühen, die trockengestellt waren gewonnen (III.2.13.2), um die Unterschiede von zum Euter gewanderten und nicht gewanderten PMN zu vergleichen (III.3.2.7).

#### **3.2.3. Bakteriologische Untersuchung der Milch**

Unmittelbar nach der Untersuchung des Euters (III.3.2.1) wurde von jedem laktierenden Viertel eine sterile Milchprobe genommen. Dafür wurde die Zitze mit Wasser gereinigt, mit Zellstoff abgetrocknet und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Nach dem Verwerfen des Vorgemelks wurde das Röhrchen für die BU in einer waagerechten Position vor der Zitze platziert (ohne in Kontakt mit der Haut der Kuh zu kommen) und mit ca. 2 bis 3 mL Milch gefüllt. Die Milchproben wurden sofort gekühlt (4°C.). Die BU erfolgte innerhalb von 30 min nach der Probenentnahme im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München.

Jede Milchprobe wurde im Labor auf drei verschiedenen Nährböden ausplattiert: auf Columbia-Schafblut-Agar (CSB) und auf die Selektiv-Nährböden Edwards-Agar und Violet-red-bile-Agar (VRB). Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und die Auswertung wurde nach 24 und nach 48 h ausgeführt. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien wurden semi-quantitativ beurteilt, indem das Wachstum von einem Keimtyp von 2 bis 10 Kolonien als „+“, das Wachstum von 11 bis 200 Kolonien als „++“ und >200 Kolonien als „+++“ gekennzeichnet wurde. Wenn in einer Probe mehr als zwei verschiedene Kolonietypen gewachsen waren, wurde die Probe als kontaminiert beurteilt.

Mit der restlichen Milch für die BU wurde die Zellzahl in der Milch mittels des Zellzahlmessgerätes „DCC“ (III.1.1) bestimmt. Dafür wurden ca. 1 µL Probe mit einer Kassette aufgenommen und automatisch im Gerät nach ca. 8 s gemessen.

#### **3.2.4. Isolierung von PMN aus der Milch**

Von den 50 mL Milch aus einem Viertel von jeder Kuh wurden jeweils 10 mL in vier Zentrifugenröhrchen mit vorgelegten 40 mL PBS (III.2.11.3) verdünnt.

Danach folgte eine Zentrifugation der Milch bei 4°C, 10 min und 400 x g. Im Folgenden wurde der Rahm entfernt, die Flüssigkeit abgekippt und das Zellpellet auf 50 mL mit PBS aufgefüllt. Der Zentrifugationsschritt und das Abkippen und Auffüllen mit PBS wurde mindestens zweimal wiederholt, bis sich kein Rahm mehr gebildet hatte. Anschließend wurde 1 mL PBS zu jedem Pellet pipettiert und die vier Pellets aus den vier Zentrifugenröhrchen wurden in ein Röhrchen überführt („gepoolt“).

#### **3.2.5. Isolierung von PMN aus Blut**

Als erstes wurde das Vollblut mittels eines automatischen Hämatologiegerätes (III.1.1) analysiert. Für die Gewinnung von PMN aus Blut wurden 15 mL Vollblut mit 15 mL PBS in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen 1:2 verdünnt. Mit einer Serumpipette und mit Hilfe einer elektronischen Pipettierhilfe (accu-jet®) wurde das Blut-PBS-Gemisch sehr vorsichtig über 15 mL Biocoll® (Dichte 1,077 g/ml) auf die Blutmischung geschichtet. Wichtig war, dass sich die beiden Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Dichten nicht vermischen, so dass das Blut-PBS-Gemisch oben bleibt. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation bei 1.300 x g bei 10°C für 30 min ohne Bremse. Nach der Zentrifugation wurden Plasma und Interphase (mit den mononukleären Zellen) abpipettiert. Somit verblieb das Erythrozyten-Pellet, welches die PMN und einen kleinen Anteil eosinophiler Granulozyten enthielt. Um die Granulozyten von den Erythrozyten zu trennen, erfolgte eine hypotone Lyse. Diese wurde durchgeführt, indem 20 mL *Aqua dest.* zu dem Pellet pipettiert wurden und das Röhrchen für 20 s geschwenkt wurde. Danach wurden sofort 20 mL des 2xPBS dazu pipettiert, um die Lyse zu stoppen. Darauf folgte eine Zentrifugation über 8 min, bei 220 x g bei 4°C, ohne Bremse. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde eine zweite Lyse durchgeführt, wodurch die noch verbliebenen Erythrozyten eliminiert wurden. Um die so gewonnenen Granulozyten zu waschen, wurde das Zellsediment erneut in 20 mL PBS resuspendiert, in ein 15 mL Röhrchen pipettiert und wieder für 8 min bei 220 x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 3 mL PBS aufgelöst.

Zusätzlich zu den Untersuchungen von PMN in Blut und Milch erfolgte die Untersuchung zum Migrationsverhalten von PMN. Dafür wurden die Zellen aus venösem Blut (III.3.2.5 und III.3.2.6) von gesunden Kühen (III.2.13.2) gewonnen und in einem Chemotaxisassay (III.3.5.3) eingesetzt. Hintergrund dieser

Untersuchung war es festzustellen, ob schon bei der Aktivierung und Migration durch eine Membran Änderungen am Methylierungs- und Acetylierungsmuster von PMN auftreten.

### **3.2.6. Fixierung und Konservierung der gewonnenen Zellen**

Die gewonnenen PMN aus Blut und Milch wurden immer direkt nach der Isolierung bis zur Durchführung der Färbung fixiert und bei -80°C eingefroren.

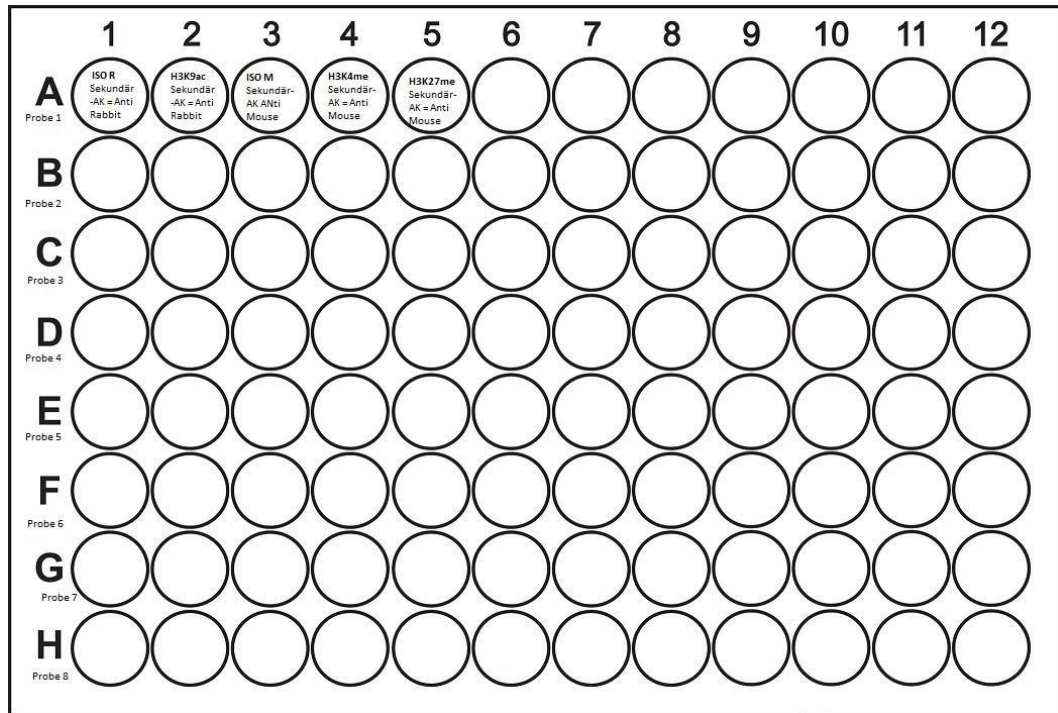
Die Zellsuspension wurde bei 700 x g und 20°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 mL 1 %iger PFA (III.2.11.1) resuspendiert und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte erneut eine Zentrifugation bei 700 x g bei 20°C für 10 min, um dann den Überstand zu verwerfen. Das Pellet wurde mit 3 mL 10 %iger DMSO-Lösung (III.2.11.1) verdünnt und in 1,5 mL Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

### **3.2.7. Methodik der intrazellulären Immunfluoreszenz-Färbung**

Der Großteil der Versuche wurden mit PMN aus Blut und Milch durchgeführt, die von der gleichen Kuh (III.2.13.1) stammen, um einen Unterschied zwischen systemischen (im Blut) und lokalen PMN die gewandert sind (in Milch) zu untersuchen. Die isolierten PMN aus dem Blut und der Milch wurden bei der Färbung gleich behandelt.

Die eingefrorenen PMN wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde die Zellsuspension nach dem Auftauen im Durchflusszytometer bestimmt. Dafür wurden 50 µL von der Zellsuspension mit 50 µL PBS verdünnt, und davon 50 µL im Durchflusszytometer bei einer Geschwindigkeit von 66 µL/min gemessen. Die Zahl an Ereignissen die in der PMN-Region lagen, wurde um den Verdünnungsfaktor 1:2 korrigiert. Die Suspension wurde anschließend auf die gewünschte Anzahl von 10<sup>5</sup> Zellen/10 µL eingestellt. Pro Probe (Tier und Tag) wurden fünf Wells im Doppelansatz pipettiert. Um die Zellen zu waschen und die Membran zu perforieren, wurde jedes Well mit 150 µL Saponinpuffer (III.2.11.1) aufgefüllt. Die Platte wurde bei 600 x g 5 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert, um dann den Überstand abzukippen. Nachdem die Platte ca. 3 s gerüttelt wurde um das Zellpellet zu lösen, wurden 20 µL von dem entsprechenden spezifischen primären AK und die Negativkontrollen (NK,= irrelevanter Antikörper) den entsprechenden Wells

zugegeben (Abbildung 2). Anschließend wurde die Platte gerüttelt und über 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.



**Abbildung 2: Platten-Layout für die intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung (Beispiel für einen Probenansatz)**

*Primäre Antikörper: Well A1: ISO R (Negativkontrolle) = Chicken anti Rabbit; Well A2: H3K9ac; Well A3: ISO M (Negativkontrolle) = Goat anti Mouse; Well A4: H3K4me3; Well A5: H3K27me3. Sekundäre Antikörper: Wells A1 und A2: Donkey anti Rabbit (FITC-markiert). Wells A3-A5: Goat anti Mouse (PE-markiert).*

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit Saponinpuffer gewaschen. Zunächst wurden 150 µL Saponinpuffer zu jedem Well pipettiert, dann wurde die Platte für ca. 3 s gerüttelt und bei 600 x g, für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, ohne Bremse. Dann wurde der Überstand der Platte abgekippt und für ca. 3 s gerüttelt. Beim zweiten Waschschrift wurden ebenfalls 150 µL Saponinpuffer in jedes Well pipettiert, für ca. 3 s gerüttelt und vor der Zentrifugation der Platte erfolgte eine dreiminütige Inkubationspause bei Raumtemperatur. Die Zentrifugation erfolgte wie beim ersten Waschschrift mit anschließendem Abkippen und Rütteln der Platte. Der dritte Waschschrift erfolgte genau wie der zweite Schritt.

Von den markierten sekundären AK (Abbildung 2) wurden 20 µL in jedes Well pipettiert, die Platte wurde gerüttelt und direkt danach 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundären AK binden sich bei dementsprechenden

spezifischen primären AK, aber nicht bei der NK.

Die Platte wurde drei Mal gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde jedes Pellet mit 50  $\mu$ L Saponinpuffer resuspendiert und in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Für die Auswertung wurden 70.000 Ereignisse von jeder Zellsuspension im Durchflusszytometer gemessen.

#### **3.2.8. Auswertung im Durchflusszytometer**

Nach der durchflusszytometrischen Untersuchung der PMN folgte die Auswertung. Die Geschwindigkeit der Messung wurde auf 66  $\mu$ L/min eingestellt und die Dauer der Messung auf 70.000 Ereignisse/50  $\mu$ L begrenzt. Bei jeder Auswertung wurde in einem Feld der SSC und FSC dargestellt, um die Region der PMN eingrenzen zu können. Im SSC und FL1 konnten die FITC-markierten (Donkey anti Rabbit, für ISO R und H3K9ac), und im SSC und FL2 die PE markierten (Goat anti Mouse, die für ISO M, H3K4me<sub>3</sub> und H3K27me<sub>3</sub>) Zellen identifiziert werden. Bei der Analyse der Daten wurden Histogramme dargestellt, um die Intensität der Fluoreszenz von jeder Messung zu erfassen. Außerdem wurde die mittlere Fluoreszenz ermittelt und gespeichert.

### 3.3. Explant-Modell

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Kultivierung von Gewebeexplants (kurz: Explant-Modell) war im Vorfeld bereits innerhalb der Arbeitsgruppe für Zitzengewebe etabliert worden (LIND et al., 2015) und wurde für Eutergewebe weiterentwickelt. Die Explants wurden nach der Gewinnung und Aufarbeitung mit verschiedenen Zusätzen im Labor kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit hitzeinaktivierten Partikeln von *E. coli* (III.2.4) und *S. aureus* (III.2.4). Hierbei wurden zusätzlich jeweils die drei Immunmodulatoren VitD<sub>3</sub> (III.2.8), SAHA (III.2.8) und S2101 (III.2.8) zugesetzt, um ihren Einfluss auf die Reaktivität der Explants zu untersuchen.

#### 3.3.1.1. Kultivierung und Präparation der Modellpathogene *in vitro*

Im Explant-Modell wurde mit den Bakterienstämmen *E. coli* 1303 und *S. aureus* 1027 gearbeitet. Die Bakterien wurden in hitzeinaktivierter Form später als Zusatz zum Medium gegeben (III.3.3.4). Die Lagerung der vitalen Keime erfolgte bei -80°C auf Cryoballs (Mikrobank-System „Cryobank™“). Als erstes wurden die Bakterien angezüchtet. Dafür wurde ein „Cryoball“ aus einem Kryoröhrchen mit *E. coli* mit einer sterilen Kanüle entnommen und auf einem VRB-Agar ausgestrichen. Dasselbe wurde für *S. aureus* auf einem CSB-Agar durchgeführt. Die Platten wurden 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert, und dann mit Parafilm eingewickelt, um diese dann im Kühlschrank für maximal zwei Wochen bei 4°C aufzubewahren. Für die KBE Bestimmung wurden in ein steriles Röhrchen mit 10 mL steriler Brain-Heart-Infusion Broth (BHI) einige der Kolonien (jeweils *E. coli* und *S. aureus*) mit einer sterilen Öse überführt. Die Inkubation erfolgte 6 h bei 37°C. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension gut gerüttelt und je 100 µL in 9,9 mL steriler Tryptic-Soy-Broth (TSB) verdünnt. Diese Suspension wurde gut gerüttelt und 18 h bei 37°C inkubiert. Für die Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden Reagenzröhrchen mit 9 mL steriler 0,9 %iger Natriumchloridlösung vorbereitet. Die Verdünnungen erfolgten in Zehnerschritten bis zu der Stufe 10<sup>-8</sup>. Anschließend wurden aus den Verdünnungsstufen 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-8</sup> je 100 µL auf VRB für *E. coli* bzw. CSB für *S. aureus* ausplattiert. Mit Hilfe von 6 bis 10 sterilen Glasperlen wurden die Bakteriensuspensionen durch leichtes Schütteln der Agar-Platten gleichmäßig verteilt, und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert.

Alle drei Verdünnungsstufen wurden in Triplikaten ausplattiert. Für die Auswertung und die KBE Bestimmung wurde bei jeder Platte, die zwischen 30 und 300 Kolonien hatte, die Anzahl an Kolonien bestimmt. Mit der folgenden Formel konnte so die durchschnittliche Anzahl der KBE in der Ursprungssuspension errechnet werden:

$$\frac{KBE}{mL} = \frac{\sum c}{(1 \times n1 + 0,1 \times n2)} \times d$$

*Berechnung der KBE Zahl.  $\sum c$  = Gesamte Anzahl an Kolonien;  $n1$  = Platten mit der niedrigsten Verdünnungsstufe;  $n2$  = Platten mit der höchsten Verdünnungsstufe;  $d$  = niedrigste Verdünnungsstufe (positiv).*

Nach drei Wiederholungen der Etablierung der KBE-Zahl und der Überprüfung, dass die Bakterien gleichmäßig wuchsen, galt die KBE Bestimmung als reproduzierbar. Die Hitzeinaktivierung der Bakteriensuspension erfolgte im Wasserbad bei 60°C über 90 min. Nach der Hitzeinaktivierung wurde die Bakteriensuspension mit PBS auf die erwünschte Konzentration ( $10^8$  Bakterien/mL) verdünnt und bei -80°C eingefroren.

### 3.3.1.2. Verdünnung der Immunmodulatoren

Die Immunmodulatoren wurden für die spätere Verwendung in Stocklösungen (III.2.11.2) mit passenden Verdünnungen aliquotiert und eingefroren. Die Stocklösungen wurden am selben Tag der Explantgewinnung auf ihre Endkonzentration verdünnt:

- VitD<sub>3</sub>: die eingefrorene Stocklösung (10 µg/mL) wurde mit 2490 µL DMEM-F12 Medium (III.2.8) auf eine Endkonzentration von 40 nM verdünnt.
- SAHA: die eingefrorene Stocklösung (2,5 mg/mL) wurde weiter verdünnt mit DMEM-F12 Medium, so dass Endkonzentrationen zwischen 1,321 µg/mL (5 nM) und 13,21 µg/mL (50 nM) vorlagen (Tabelle 5).
- S2101: die eingefrorene Stocklösung (1 mg/mL) wurde weiter verdünnt mit DMEM-F12 Medium, so dass Endkonzentrationen zwischen 0,156 µg/mL (0,5 µM) und 1,56 µg/mL (5 µM) vorlagen (Tabelle 5).



**Tabelle 5: Übersicht zu den Versuchsansätzen des Explant-Modells**

| <i>Versuch</i> | <i>Tier-Nr.</i> | <i>Immunmodulator</i> | <i>Konzentration</i> |
|----------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
| 1              | 1, 2, 5         | VitD <sub>3</sub>     | 40 nM                |
| 2              | 6, 7, 8         | VitD <sub>3</sub>     | 40 nM                |
| 3              | 9, 10           | SAHA und S2101        | 5 nM und 0,5 µM      |
| 4              | 11, 12          | SAHA und S2101        | 5 nM und 0,5 µM      |
| 5              | 13, 14          | SAHA und S2101        | 50 nM und 5 µM       |
| 6              | 15, 16          | SAHA und S2101        | 50 nM und 5 µM       |
| 7              | 17, 18          | SAHA und S2101        | 50 nM und 5 µM       |
| 8              | 19              | SAHA und S2101        | 50 nM und 5 µM       |
| 9*             | 20              | Vitalitätstest        | 50 nM und 5 µM       |
| 10*            | 21, 20          | Vitalitätstest        | 50 nM und 5 µM       |

\* Vitalitätstest (III.3.4).

### 3.3.1.3. Plattenvorbereitung

Zusätzlich zur Verdünnung der Immunmodulatoren erfolgte die Vorbereitung der Platte für die Explantkultur. Eine 24 Well-Platte wurde am Tag der Gewebebegewinnung mit 1 mL „Eutermium“ (III.2.11.2) pro Well gefüllt, dann für eine Stunde (h) im Brutschrank (bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>) vorinkubiert und anschließend sofort im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt. Wenn das Medium bei der Vorinkubation trüb war (Verdacht auf Kontamination) wurde es verworfen und neu angesetzt.

### 3.3.2. Klinische Untersuchung der Spendertiere für die Gewebebegewinnung

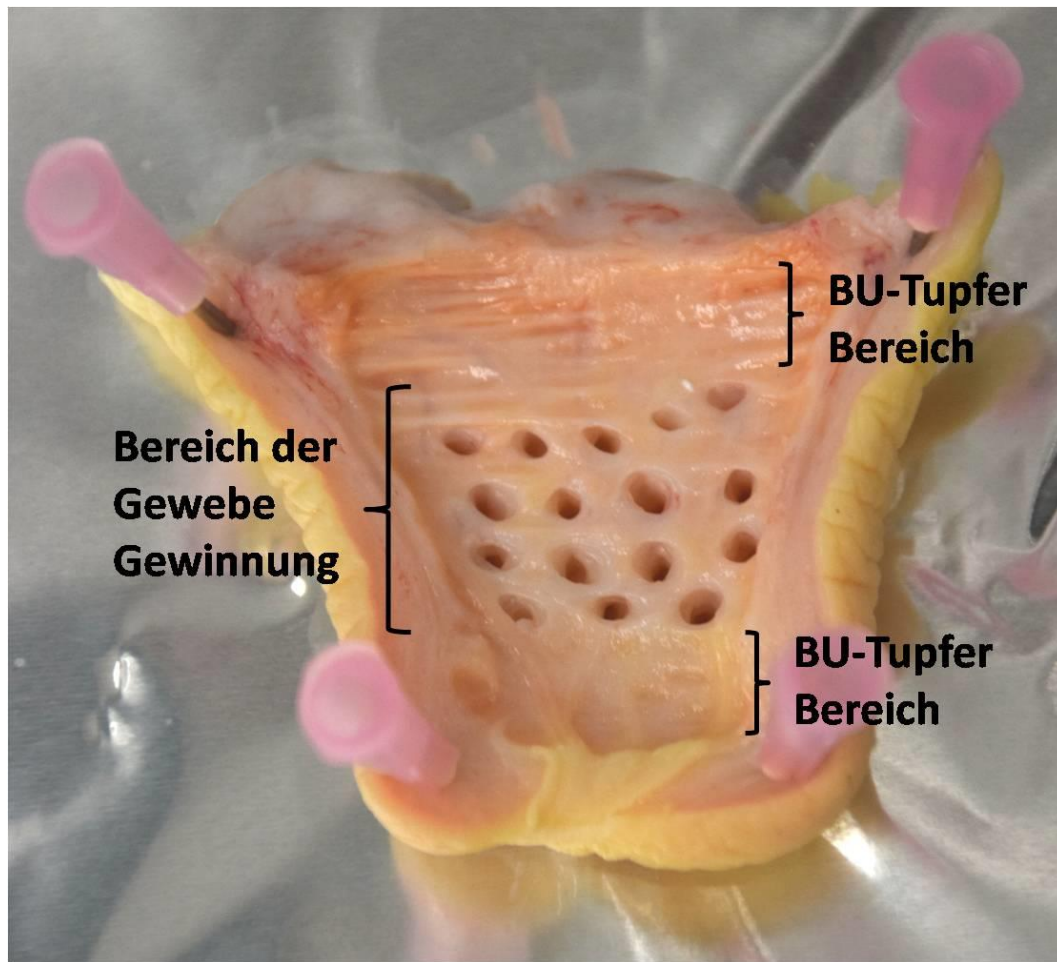
Die zu verwendenden Tiere (III.2.13.3) wurden am Schlachthof unmittelbar nach der Einlieferung ausgewählt. Die Kühe durften keine Lahmheit zeigen, mussten allgemeingesund und eutergesund sein und eine Rektaltemperatur unter 39,5°C aufweisen. Für die Beurteilung des Euters wurde als erstes eine adspektorische und palpatorische Untersuchung durchgeführt (ROSENBERGER; 1990). Anschließend wurde das Sekret makroskopisch beurteilt und ein CMT angewendet (Tabelle 4). Zusätzlich wurde die Zellzahl mittels eines tragbaren Zellzahlmessgerätes bestimmt. Für eine BU wurde eine sterile Milchprobe von jedem laktierenden Viertel genommen (III.3.2.3). Die Milchprobe wurde sofort gekühlt (in einer Styroporbox auf Eis). Die BU erfolgte wie unter III.3.2.3 beschrieben. Die BU war notwendig um eine intramammäre Infektion mit „major mastitis pathogens“ auszuschließen (MCDOUGALL et al., 2009).

Bei jeder Kuh wurde das Viertel mit dem niedrigsten CMT Wert und der niedrigsten Milch-Zellzahl ausgewählt. Der Zellzahl-Wert sollte unter 200.000 Zellen/mL liegen. Das Euterviertel wurde farblich markiert und die Herdbuchnummer der Kuh wurde dokumentiert.

#### **3.3.3. Gewebegewinnung**

Unmittelbar nach der Schlachtung (ca. 10 bis 12 min) wurde das Euter abgetrennt und in eine saubere Kunststoffkiste gelegt. Mit Wasser wurde zunächst das gesamte Euter gesäubert, mit Zellstoff abgetrocknet und die Haut des Zielviertels wurde mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Gewebeproben wurden aus zwei Lokalisationen gewonnen, zuerst erfolgte die Probeentnahme an der ZZ und anschließend am EP desselben Viertels.

Mit Hilfe eines Schlachtermessers wurden die Zitzen an der Basis abgetrennt und auf eine mit steriler Alufolie bedeckte Styroporfläche gelegt. In den Strichkanal wurde ein steriler Venenverweilkatheter (Größe in G, III.2.2) eingeführt. Ein Längsschnitt der Zitze erfolgte mittels eines sterilen Skalpell (Skalpell Klinge Größe 21). Nach Eröffnung der Zitze wurde diese mit Hilfe von vier Kanülen aufgespannt. Als erstes wurde eine Tupferprobe (für eine BU) im distalen und proximalen Bereich der ZZ gewonnen. Im mittleren Bereich der ZZ wurden die Gewebeproben gewonnen (Abbildung 3). Dafür wurde das Biopsie Gerät BARD® Magnum™ verwendet.



**Abbildung 3: Gewebebegewinnung aus der Zitze**

*Distal und proximal der Zitzenzisterne wurden die Tupferproben für die bakteriologische Untersuchung gewonnen. Im mittleren Bereich erfolgte die Gewebeentnahme.*

Für jedes Viertel und jede Lokalisation (ZZ und EP) wurde eine sterile BARD Magnum® Core Tissue Biopsy Nadel (12 G x 13 cm – Länge Sample Notch 1,9 cm) in das Biospiegergerät eingespannt. Die Spitze der Biopsienadel wurde auf die Schleimhaut aufgesetzt. Durch Auslösen des Biopsieinstrumentes wurde an der entsprechenden Stelle ein Gewebestückchen aus der Zitzenwand (ca. 2 x 8 mm) herausgestanzt. Es wurde darauf geachtet, dass keine äußere Haut in dem Biopstat vorhanden war. Diese wurde im Bedarfsfall durch Scherenschlag abgesetzt. Pro Lokalisation und Tier waren 12 (für die Versuche mit VitD<sub>3</sub> III.3.3.4) oder 18 (für die Versuche mit SAHA und S2101, III.3.3.4) Biopstate nötig.

Nach der Probenentnahme an der Zitze erfolgte der gleiche Prozess für das EP. Hierfür wurde mit einem Messer die Haut großflächig entfernt und mit einem zweiten desinfizierten Messer ein ca. 5 x 5 cm großes Stück Parenchym herausgeschnitten. Aus diesem Gewebestück wurden dann, wie bereits für die

Zitzen beschrieben, mittels BARD® Magnum™ Biopsy Instruments 12 bis 18 Biopate ausgestanzt.

Von jedem Tier wurden alle Biopate aus einer Lokalisation mit Hilfe einer anatomischen Pinzette aus der Biopsienadel entfernt, und in ein Gefäß mit sterilem, gekühlten (4°C) PBS (III.2.11.3) eingeführt. Es wurden jeweils 12 oder 18 Proben derselben Lokalisation in ein Probengefäß mit sterilem PBS gegeben. Die Gefäße mit den Gewebeproben, sowie die BU-Tupfer und Milchproben, waren während des Transportes vom Schlachthof bis zum Labor in einer Styroporbox auf Eis gelagert. Die Zeit zwischen Probenentnahme und Aufarbeitung im Labor betrug zwischen 60 und 90 min.

Die Methodik für die Eutergewebegewinnung erfolgte wie etabliert und beschrieben in der Dissertation von Dr. LIND (2011).

#### **3.3.4. Aufarbeitung und Inkubation der Explants**

Unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Sicherheitswerkbank (III.1.2), wurden die Biopate in gleichmäßig große Explants geschnitten. Dafür wurde das Gewebe mit etwas PBS in eine Petrischale gekippt, mit einer anatomischen Präzisionspinzette fixiert und mit einem Skalpell mit Klingen der Größe 15 seziert. So entstanden Explants in zylindrischer Form, mit einer Größe von ca. 2 x 2 mm. Bei der ZZ wurde darauf geachtet, dass bei jedem Explant die Schleimhaut erhalten blieb. Nach jedem Tier und jeder Lokalisation wurde eine neue sterile Skalpellklinge und Pinzette verwendet.

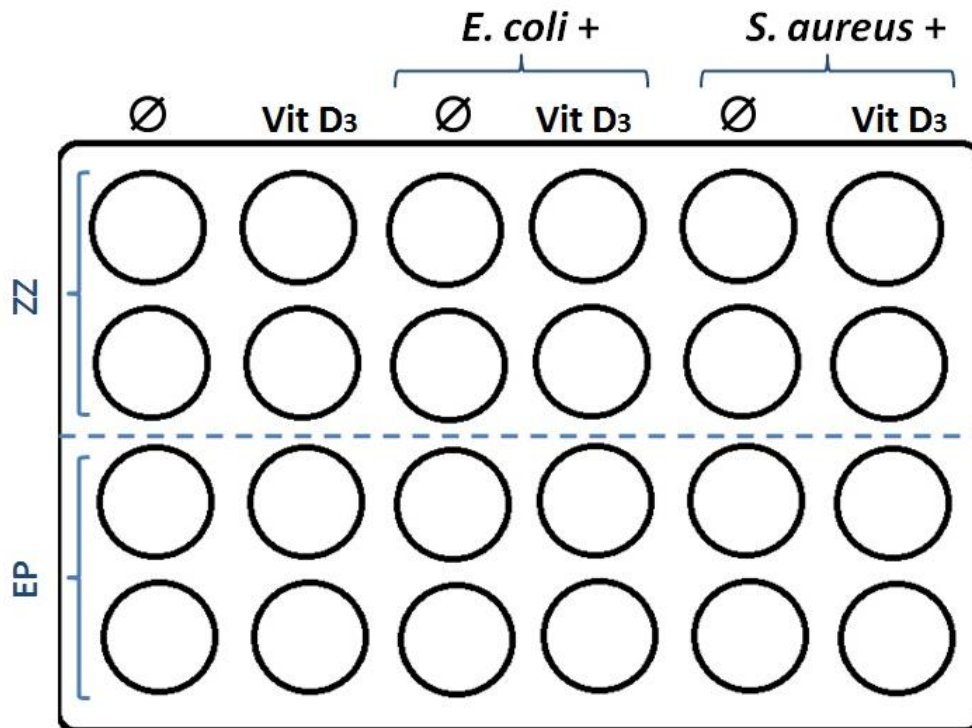
Nach der Aufarbeitung der Explants erfolgte die Überführung in die vorbereitete 24-Well-Platte (III.3.3.1.3) die auf 4°C vorgekühlt war. Pro Well befand sich ein Explant in 1 mL „Eutermium“ (III.2.11.2). Anschließend wurde die 24-Well-Platte für 1 h bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um die Explants ruhen zu lassen.

Nach der einstündigen Pause wurde das Medium abgesaugt (bis auf ca. 30 µL) und erneut 1 mL Medium dazu pipettiert, aber diesmal jeweils mit und ohne Immunmodulatoren.

#### *Stimulationsansätze mit VitD<sub>3</sub>*

Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Für jede Lokalisation gab es Kontrollansätze, die nur Medium enthielten und Ansätze, die VitD<sub>3</sub> enthielten. Alle

Ansätze wurden entweder mit *S. aureus* oder mit *E. coli* stimuliert oder blieben unstimuliert (Abbildung 4). Die Endkonzentration von VitD<sub>3</sub> (III.2.11.2) pro Well betrug 40 nM (III.3.3.1.2).



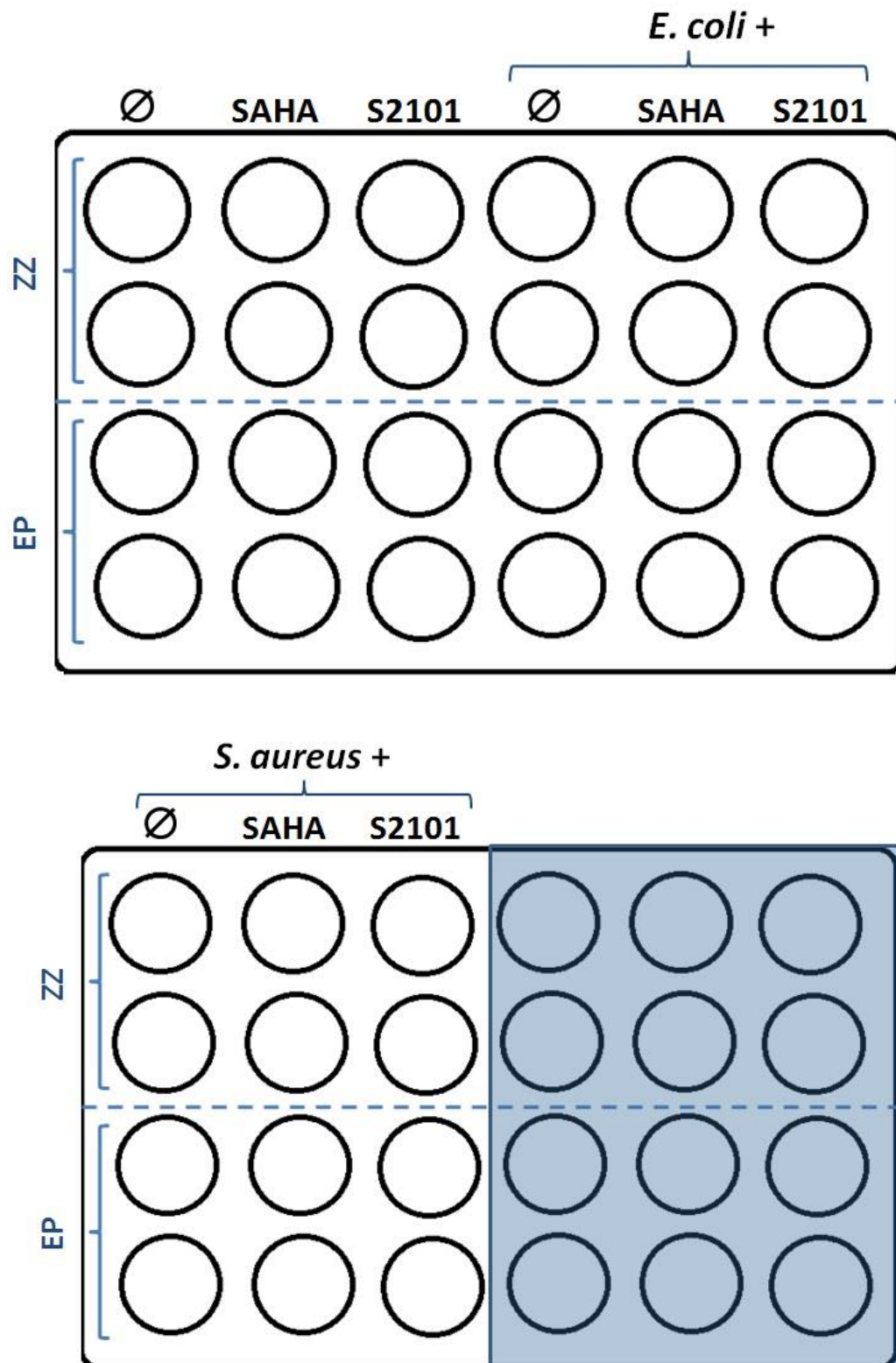
**Abbildung 4: Plattenlayout für Stimulationsversuche mammärer Explants unter Zugabe von VitD<sub>3</sub>**

*n* = 6. ZZ = Zitzenzysterne; EP = Euterparenchym. Ø = ohne Zusatz (nur „Eutermidium“).

#### *Stimulationsansätze mit SAHA und S2101*

Die Versuche welche mit den Immunmodulatoren SAHA und S2101 (III.2.11.2) durchgeführt wurden, wurden ebenfalls im Doppelansatz durchgeführt. Eine Übersicht zu den unterschiedlichen Ansätzen ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

Von der hitzeinaktivierten Bakteriensuspension (*E. coli* oder *S. aureus*) wurden jeweils 100 µL pro Well hinzupipettiert.



**Abbildung 5: Plattenlayout von den Versuchen mit SAHA und S2101**

$n = 11$ . ZZ = Zitzenzisterne; EP = Euterparenchym.  $\emptyset$  = ohne Zusatz (nur „Eutermium“).

Nach der Zugabe von Medium mit oder ohne Stimuli (Bakterien und/oder Immunmodulatoren), wurden die Explants mit VitD<sub>3</sub> 18 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Explants von den Versuchen mit SAHA und S2101 (3 bis 8) wurden zuerst 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel und eine erneute Inkubation über 18 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach der Inkubationszeit wurden Explants und Überstände voneinander getrennt und separat aufbewahrt für die nachfolgenden Untersuchungen: Der Überstand wurde abpipettiert. Die ersten 300 µL wurden für die späteren AlphaLISA® Untersuchungen (III.3.7) in ein Eppendorf Gefäß gegeben. Das restliche Volumen (ca. 700 µL) wurde in ein 1,5 mL Röhrchen pipettiert, um später die funktionellen Untersuchungen durchzuführen (III.3.5 und III.3.6). Alle Überstände und die Explants wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen der Explants wurden diese nach der Entnahme der Überstände für die Lagerung aufbereitet. Es wurde zu jedem Explant 500 µL RNAlater® hinzupipettiert. Der Inhalt von jedem Well (Explant + RNAlater®) wurde in ein Kryoröhrchen überführt und 22 h im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Danach wurden die Explants mit RNAlater® bei -80°C eingefroren.

Die Durchführung des letzten Versuches (Tier Nr. 19) erfolgte wie oben beschrieben. Allerdings wurde zusätzlich eine 24-Well Platte verwendet, auf der der erste Inkubationsschritt über 24 h nur mit dem Immunmodulatoren ohne den Zusatz von Bakterien erfolgte. Erst für den zweiten Inkubationsschritt über 18 h wurden die Bakterien hinzugefügt. Der Hintergrund dieses zusätzlichen Versuches war es herauszufinden, ob sich ein „*Priming*“-Effekt (II.2.1) des Immunmodulatoren in den ersten Stunden erzielen lässt.

#### **3.4. Beurteilung der Gewebevitalität**

Für die Beurteilung der Vitalität der Explants von der ZZ und dem EP während und nach der Inkubation im Labor wurde der „Water Soluble Tetrazoliumsalts 1 (WST-1)“-Test verwendet. Der Hintergrund der Methodik basiert auf dem Nachweis einer aktiven Atmungskette der Zelle. WST-1 wird durch eine endogene Dehydrogenase in dunkelrotes Formazan umgesetzt, das photometrisch bei 450 nm gemessen werden kann.

Die Explantgewinnung und Inkubation erfolgte analog zu den mit SAHA und S2101 durchgeführten Versuchen (III.3.3.3 und III.3.3.4). Die ausgewählten Tiere

(Nr. 20 bis 22) erfüllten die gleichen Kriterien wie unter III.3.3.2 beschrieben. Die Messung der Vitalität erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten: am ersten Tag, direkt nach der Ruhepause der Explants im gekühlten „Eutermium“ (III.3.3.4), am zweiten Tag während des Mediumwechsels (III.3.3.4) und am dritten Tag, bevor die Überstände und Explants zur Aufbewahrung (III.3.3.4) getrennt wurden. Dem Medium jedes Explants wurden jeweils 30 µl WST-1 Lösung (III.2.8) hinzugegeben und 3 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde von jedem Well 300 µL vom Überstand abpipettiert und in eine 96-Well-Platte überführt. Analysiert wurde die Platte photometrisch bei 450 nm (Clariostar III.1.2). Es wurden immer zwei NK mitgeführt: einmal 300 µL nur von dem „Eutermium“, in dem die Explants kultiviert wurden (III.2.11.2) und einmal 270 µL von dem „Eutermium“ mit 30 µL WST-1 (NK). Als Positivkontrolle (PK) wurden Explants der jeweiligen Lokalisation (ZZ und EP) nur mit „Eutermium“ (ohne Pathogen-Stimulus oder Immunmodulator) inkubiert.

Die OD der MK (mit WST-1) zeigte Werte, die ca. 35 % der PK entsprachen. Explants, deren Überstände einen OD-Wert > 50 % der PK aufwiesen wurden als vital eingestuft. Die Explants mit einer OD zwischen 40 % und 50 % der PK-Werte wurden als „leicht geschädigt“ eingestuft. Werte niedriger als 40 % der PK galten als „nicht vital“.

#### **3.5. Funktionelle Untersuchungen zur Chemotaxis von PMN**

Die Überstände von den kultivierten Explants (Versuch 1 bis 8) wurden in einem Chemotaxisassay auf ihren Gehalt an funktionell aktiven Chemokinen untersucht. Die Methode wird mittels einer Kammer durchgeführt, deren obere und untere Vertiefungen (Wells) durch eine Membran getrennt sind. Das Prinzip dieser Methode ist es die Funktionalität und das Migrationsverhalten der PMN zu testen, indem diese Immunzellen durch verschiedene Substanzen angelockt werden (Chemokine, Zytokine, etc.) und aktiv durch eine Polycarbonatmembran bis zu dem Stimulus wandern. Die Membran ist 10 µm dick und hat eine Porengröße von 3 µm. Die Größe der PMN liegt zwischen 9 und 12 µm, d.h. dass sie nicht durch die Poren der Membran passen, sondern aktiv hindurch wandern müssen. Die gewanderten PMN sammeln sich in der unteren „blinden“ Vertiefung. Dieses Verfahren ermöglicht die Migration der Zellen quantitativ zu messen und somit den Gehalt chemoattraktiver Faktoren nachzuweisen.



### 3.5.1. Gewinnung von venösem Blut

Die Gewinnung von venösem Blut erfolgte nach der gleichen Methode wie für die ICIF-Färbung (III.3.2.2), allerdings stammt das Blut von einer gesunden, trockengestellten Kuh (III.2.13.2). Für alle durchgeführten Isolationen wurde das gleiche Tier verwendet.

### 3.5.2. Zellisolierung der PMN aus Blut

Die Isolierung der PMN erfolgte nach demselben Protokoll, wie für die ICIF-Färbung (III.3.2.5). Bei dem letzten Schritt wurden statt 3 mL PBS, 3 mL DMEM-12 Medium hinzupipettiert.

### 3.5.3. Chemotaxisassay

In dem Chemotaxisassay wird eine 10-Well-Transmigrationskammer verwendet. Sie besteht aus einer Acrylbodenplatte, einer Acryldeckplatte, einer Silikon-dichtungsmatte und sechs Schrauben. In der Bodenplatte befinden sich zehn Rundboden-Vertiefungen oder „untere Wells“ (UW) mit einem Volumen von ca. 420 µL. Diese korrespondieren mit den „oberen Wells“ (OW) der Deckplatte und fassen ein Volumen von ca. 285 µL. Die Trennung zwischen OW und UW entsteht bei dem Zusammenbau der Kammer, indem man zwischen Bodenplatte und Deckplatte eine zwischenliegende Polycarbonatmembran platziert, die den Boden des OW erschafft. Die Polycarbonatmembran hat eine Porengröße von 3 µm und auf einem Quadratzentimeter befinden sich ca.  $2 \cdot 10^6$  Poren. Zwischen Bodenplatte und Deckplatte wird die Silikonmatte platziert, die für Abdichtung sorgt.

Nachdem das Pellet mit dem Medium gemischt wurde, erfolgte die automatisierte Quantifizierung der Zellzahl. Es wurden 50 µL der Zellsuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und in einem automatischen Hämatologie-Analysesystem (III.1.1) gemessen. Die Berechnung des benötigten Volumens der Zellsuspension erfolgte durch folgende Formel:

$$\frac{\text{Gewünschtes Volumen (mL)}}{\text{Anzahl PMN pro mL} / 5 \cdot 10^6} = \text{mL Zellsuspension}$$

Die errechnete Menge an Zellsuspension wurde in ein Röhrchen (5 mL) pipettiert. Der Rest wurde auf das gewünschte Volumen mit Medium aufgefüllt.

Pro Kammer wurden zwei der zehn Wells für eine NK und eine PK verwendet. Die

NK enthielt lediglich das entsprechende Medium, das für die Kultivierung der Explants verwendet wurde (III.2.11.2). Die PK enthielt IL-8 mit einer Konzentration von 100 ng/mL.

In jedes UW wurden 300 µL von den jeweiligen Kontrollen oder den Überständen pipettiert. In die ersten zwei Wells kamen die NK und die PK und in die restlichen Wells wurden die Überstände der Explants im Doppelansatz pipettiert. Pro Versuch wurden immer drei Kammern verwendet, d.h. es wurden 12 Überstände pro Tag getestet, immer von dem gleichen Tier und der gleichen Lokalisation. Das UW wurde mit ca. 130 µL Easycoll (1,13 g/mL, III.2.8) unterschichtet, bis sich ein positiver Flüssigkeitsmeniskus bildete. Diese Unterschichtung wird zum Volumenausgleich und zur Vermeidung von Zelladhäsion durchgeführt. Beim Pipettieren der Flüssigkeiten in die Wells wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen.

Zunächst wurde mit Hilfe von zwei Präzisions-Pinzetten die Membran mit der glänzenden Seite nach oben auf die UW der Kammer gelegt, so dass alle bedeckt waren. Die glänzende Seite der Membran ist die weniger adhärente Seite, sie formt zudem den Boden des OW. Danach wurde eine Silikondichtung auf die Membran gelegt, welche im Bereich der Wells Löcher enthält. Darüber wurde das obere Kammerteil gelegt und mit sechs Schrauben an dem unteren festgemacht. In jedes OW wurden 200 µL mit der PMN Lösung in der gewünschten Konzentration ( $5 \cdot 10^6$  PMN/mL) pipettiert. Im Anschluss wurden die Kammern bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 h im Brutschrank inkubiert. In diesem Zeitraum können die PMN aus dem OW aktiv in das UW auf einen chemotaktischen Reiz hinwandern.

Zehn Minuten vor Inkubationsende wurden der Anzahl der Proben entsprechend 5 ml Rundbodengefäße beschriftet und mit 125 µL DMEM-12 Medium befüllt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kammern und die beschrifteten Röhrchen auf Eis gelegt. Die Zellsuspension des OW wurde abpipettiert und verworfen. Um an die gewanderten PMN im UW zu gelangen, wurde der obere Kammerteil, die Silikondichtung und die Membran auf einmal abgenommen. Der Inhalt des UW wurde mit Hilfe einer Pipette resuspendiert und davon anschließend 350 µL abpipettiert und zu jedem Röhrchen hinzugegeben.

Die Membran wurde verworfen, weil sie nur einmal verwendbar ist. Die restlichen

Teile der Kammern wurden für ca. 1 h bei Raumtemperatur in *Aqua dest.* gelegt, und danach zweimal mit frischem *Aqua dest.* ausgewaschen.

Es wurde eine regelmäßige Reinigung der Kammern mit 1 N Natriumoxyd-Lösung für 2 h bei 60°C durchgeführt, um Proteine und andere Verunreinigungen aus den Wänden und Kammervertiefungen zu entfernen.

#### **3.5.4. Durchflusszytometrische Auswertung**

Die Röhrchen wurden gut gemischt und an die Ansaugstation des Durchflusszytometers gestellt. Jede Messung wurde standardisiert, so dass immer das gleiche Volumen gezählt wurde. Die Geschwindigkeit war auf 66 µL/min eingestellt und das Endvolumen auf 100 µL bestimmt. Die Daten wurden aus der Anzahl an gemessenen Ereignissen in der auf PMN eingestellten Region („Gate“) erfasst (eingestellt auf FSC und SSC).

#### **3.5.5. Ermittlung der relativen Transmigrationsrate**

Die Ergebnisse, die im Durchflusszytometer erfasst wurden, umfassten nur die Anzahl der PMN, die sich im UW befunden hatten. Zur besseren Vergleichbarkeit von Messungen unterschiedlicher Tage wurde die relative Transmigrationsrate (MR) ermittelt. Dazu wurde als erstes der Mittelwert (MW) der Doppelansätze aus der Migrationskammer berechnet. Die MR wurde auf die PK (100 ng/mL IL-8) derselben Kammer bezogen. Dabei wurde die PK als 100 % angenommen. Somit sollten tagesabhängige Unterschiede hinsichtlich des Aktivierungsgrads und Migrationsverhalten der PMN minimiert werden. Die Migrationsrate wurde wie folgt berechnet:

$$Migrationsrate (PMN \%) = \frac{MW \text{ PMN} \times 100}{PMN (PK)}$$

Ausgewertet wurden somit die relative Anzahl migrierter PMN in Explantkulturüberständen im Verhältnis zu dem Chemokin IL-8 (PK).

#### **3.6. Fluo-4 Färbung**

Zusätzlich zu dem Chemotaxisassay wurden die Überstände von den kultivierten Explants mit der Fluo-4 Färbung als eine zweite funktionelle Methode getestet. Diese Methode misst der intrazelluläre Calcium ( $Ca^{2+}$ )-Influx von PMN. Dies geschieht mit Hilfe des Farbstoffs Fluo-4-Acetoxymethylester (Fluo-4), der sich an

$\text{Ca}^{2+}$  bindet und im Durchflusszytometer als messbares Fluoreszenzsignal strahlt. Das Fluo-4 wird durch zytoplasmatische Esterasen gespalten und in seine geladene Form überführt. Als geladenes Molekül verbleibt Fluo-4 in der Zelle und bindet dort an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Wenn PMN in Kontakt mit einem aktivierenden Stimulus kommen, steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der zellulären Matrix.

#### **3.6.1. PMN-Gewinnung**

Die Gewinnung von venösem Blut erfolgte nach der gleichen Methode wie für die ICIF-Färbung (III.3.2.2). Das Blut stammte von einer gesunden trockenstehenden Kuh (III.2.13.2). Zur PMN-Isolation wurde immer dasselbe Tier verwendet.

Die Isolierung von PMN aus venösem Blut erfolgte wie in der Zellseparation bei der ICIF-Färbung (III.3.2.5). Beim letzten Schritt wurden statt 3 mL PBS, 3 mL DMEM-12 Medium dem Pellet hinzupipettiert.

#### **3.6.2. Fluo-4 Färbung**

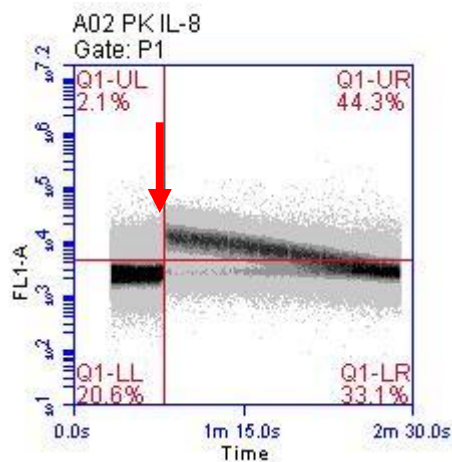
Die eingefrorene Stocklösung von 50  $\mu\text{g}$  Fluo-4 vorverdünnt in 5  $\mu\text{L}$  DMSO (III.2.11.2) wurde aufgetaut und mit 95  $\mu\text{L}$  FCS (III.2.8) versetzt. Von der Farbstofflösung wurden 2  $\mu\text{L}$  pro 3 mL Zellsuspension pipettiert, resuspendiert und für 30 min bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 180 x g, 6 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet wurde nach Zugabe von 3 mL HBSS gut gerüttelt und erneut wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgekippt. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 mL HBSS vermischt, resuspendiert und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Ruhepause wurden 150  $\mu\text{L}$  der gefärbten Zellsuspension in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und mit 1  $\mu\text{L}$  Propidiumjodid (PJ) 2,99 mM versetzt. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und für 1 min inkubiert. PJ interkaliert mit der DNA toter Zellen und strahlt mit einer Rotfluoreszenz, die auf dem Emissionsspektrum FL3 im Durchflusszytometer messbar ist.

#### **3.6.3. Durchflusszytometrische Messung der Fluo-4 Färbung**

Die Messung wurde mit drei unterschiedlichen Messeinstellungen in drei Fenstern erfasst und dargestellt. Im ersten Fenster wurde der Kanal FL1 (Grünfluoreszenz für Fluo-4) und die Zeit dargestellt. Im zweiten Fenster wurde der Kanal SSC und

FL3 (Rotfluoreszenz für PJ) dargestellt, um den Anteil an lebenden und toten PMN zu beurteilen. Im dritten Fenster wurden FL1 und die Zeit dargestellt, allerdings wurde hier nur noch auf die lebenden PMN ein ‚Gate‘ gesetzt: Die Region mit den toten Zellen (FL3-positiv) wurde ausgeschlossen. Zusätzlich wurde eine Trennung zwischen vier Quadranten eingestellt (Abbildung 6). Die Geschwindigkeit der Messung war auf 66  $\mu\text{L}/\text{min}$  und die Zeit auf 2 min und 30 s eingestellt. Der Zusatz (immer 50  $\mu\text{L}$ ) von jedem Stimulus (PK, NK oder Überstände) erfolgte 20 s nach Beginn der Messung. In der ersten NK wurde nur Medium über einen Zeitraum von 2 min gemessen. Bei der zweiten NK wurde nach 20 s anstelle eines Stimulus 50  $\mu\text{L}$  HBSS dazugegeben. Außerdem gab es zwei PK: eine erste bestand aus IL-8 (100 ng/mL) und eine zweite aus Ionomycin (1 mg/mL). Die PK mit IL-8 wurde zur späteren relativen Auswertung der Daten verwendet. Ionomycin ist in der Lage  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Zellwand zu transportieren und eignet sich daher als absolute PK. Nach der Messung der zwei NK und der zwei PK erfolgte die Messung der Proben. Für jede Messung wurde ein anderer Überstand (50  $\mu\text{L}$ ) der Explantkultur als Stimulus verwendet.



**Abbildung 6: Durchflusszytometrische Erfassung des Calcium-Influx bei PMN**

Dargestellt ist die Grünfluoreszenz (FL1) des  $\text{Ca}^{2+}$  bei PMN nach Fluo-4-Färbung gegen die Zeit (Time). Zwanzig Sekunden nach Beginn der Messung wurden 50  $\mu\text{L}$  IL-8 hinzugegeben (roter Pfeil). Hierdurch steigert sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und somit die Fluoreszenz (erfasst im oberen rechten Quadranten rechts in Q1-UR).

Der gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx wurde als Fluoreszenz im dritten Fenster (FL1 gegen die Zeit) erfasst. Die Fluoreszenz, die nach der Zugabe des Stimulus höher als die Basislinie strahlte (Abbildung 6, Quartil Q1-UR) wurde anhand einer Quadrantenanalyse erfasst und für die Auswertung verwendet. Für jede Messung mussten die

Quadranten neu angepasst werden.

#### **3.6.4. Ermittlung der relativen Calcium-Strömungsrate**

Um die Ergebnisse besser darzustellen und von unterschiedlichen Messtagen besser vergleichen zu können, wurden die Rohdaten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx als Strömungsrate ausgedrückt. Dies beschreibt, wieviel Prozent des  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Öffnung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle freigesetzt wurde. Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömungsrate zu ermitteln, wurden als Erstes der MW der Doppeleinsätze des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus den Quartil Q1-UR nach der Zugabe des Stimulus berechnet (Abbildung 6). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömungsrate (in Prozent) auf 100 ng/mL IL-8 (PK) wurde wie folgt bestimmt: der MW der PK wurde auf 100 % gesetzt. Die übrigen Messungen wurden rechnerisch in Relation zur PK des jeweiligen Tages wie folgt berechnet:

$$\text{relative Calcium – Strömungsrate (\%)} = \frac{\text{MW Calcium Influx (Ü)} \times 100}{\text{MW Calcium Influx (PK)}}$$

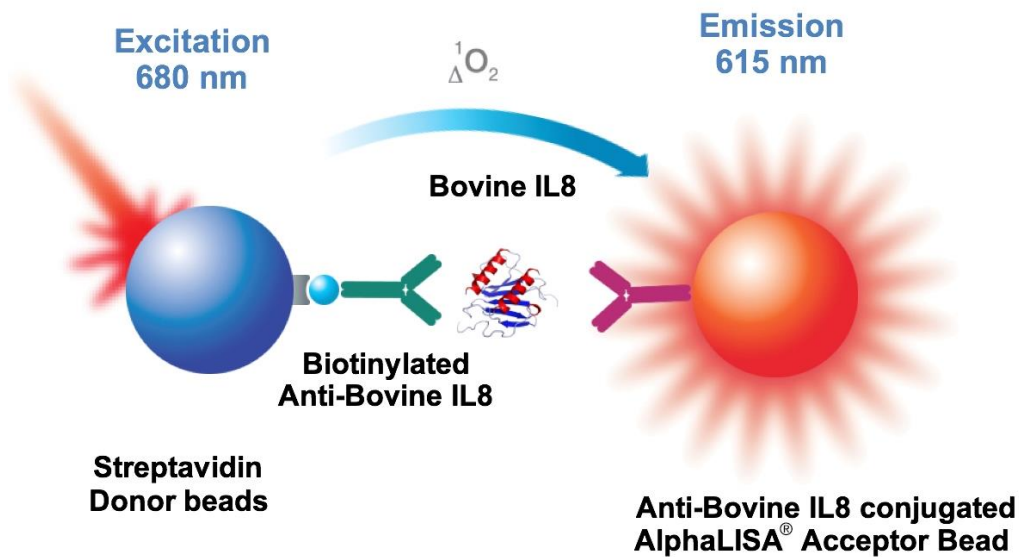
Ausgewertet wurde somit die relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömungsrate auf Explantkultur-Überstände.

#### **3.7. AlphaLISA®**

Zusätzlich zu den beschriebenen durchflusszytometrischen Methoden (III.3.1, III.3.5 und III.3.6) wurden die Überstände von den Explants (III.3.3.4) aus Versuchen 5 bis 8 (Tiere 13 bis 19) auch auf Produktebene getestet. Die getesteten Produkte waren IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und wurden mittels AlphaLISA® untersucht.

Das AlphaLISA® Prinzip basiert auf einer Annäherungs-Fluoreszenz zwischen Akzeptor- und Donorbeads. Der Akzeptorbead ist mit Anti-Substanz-X-AK konjugiert. Der zweite (freie) AK ist Biotin-gekoppelt. Der Donorbead ist mit Streptavidin konjugiert. Zuerst werden zu der Probe die Akzeptorbeads und die freien AK hinzugefügt, woraufhin sich während der Inkubationspause ( $\geq 30$  min) ein Antikörper-Substanz-Komplex bildet. Anschließend werden die Donorbeads hinzupipettiert. Das Streptavidin von den Donorbeads bindet an das Biotin der freien AK. Die Donorbeads enthalten photosensitive Moleküle, die nach einer Anregung bei 680 nm ihre Energie auf den umgebenden molekularen Sauerstoff

übertragen. Nur wenn sich Donor- und Akzeptorbead im Rahmen des Antikörperkomplexes in direkter räumlicher Nähe befinden, reagiert der angeregte Sauerstoff. Dies löst eine Kaskade der Energieübertragung zu den Akzeptorbeads aus, die zu einem scharfen Peak der Lichtemission bei 615 nm führt (Abbildung 7). Wenn die Konzentration des Substrats niedrig ist, befinden sich weniger Partikel in räumlicher Nähe zueinander, d.h. es werden weniger Sauerstoffmoleküle übertragen und somit ist die Lichtemission geringer.



**Abbildung 7: das AlphaLISA®-Prinzip**

*Dargestellt ist das Prinzip des AlphaLISA® anhand des Beispiels von bovinem Interleukin 8. (Quelle: Perkin Elmer).*

Die Hauptvorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität, die leichte Messbarkeit und das sehr geringe Probenvolumen, das benötigt wird. Im Gegensatz zu den konventionellen ELISA-Techniken gibt es keine Waschschrte und nur zwei Inkubationen von maximal 90 min.

Alle Versuche für dasselbe Tier wurden mit der gleichen Charge des AlphaLISA® Testkits durchgeführt.

### 3.7.1. Erstellung einer Standardkurve

Um eine absolute Quantifizierung des Produkts durchführen zu können, wurde zunächst eine Standardkurve erstellt: die Stocklösungen von IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 oder TNF $\alpha$  wurden jeweils in Zehnerverdünnungsschritten zwischen 3000 pg/mL und 0,3 pg/mL in Triplikaten angesetzt. Die aus Proben ermittelten Werte, die

außerhalb der Standardwerte lagen (oberer oder unterer Bereich) konnten nicht erfasst werden. Nur Werte, die im Bereich der Standardkurve lagen wurden zur Auswertung herangezogen.

Bei jedem nachgewiesenen Produkt wurde am Anfang von jeder Charge der LDL („lower detection limit“)-Wert mit 12 Punkten des Leerwertes berechnet. Für die nachfolgenden Versuche mit Standardkurven der gleichen Charge wurde der Leerwert nur einmal in Triplikaten bestimmt. Die Vorgehensweise erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **3.7.2. Testdurchführung**

Die Durchführung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung von jedem Kit angegeben. Das Probenvolumen lag bei 2 µL für die Messung von IL-1β, IL-8 (AL545C) und TNFα. Bei IL-10 wurde ein 5 µL-Protokoll verwendet. Nach der Vorbereitung der Reagenzien wurden als erstes die Proben in die 384-Well-Platte pipettiert. Alle Proben wurden immer in Duplikaten pipettiert. Anschließend wurden bei den 2-Schritt-Protokollen (IL-8 und IL-10) die Akzeptorbeads und die AK (III.2.9) hinzupipettiert. Darauf erfolgte eine Inkubation von 60 min bei Raumtemperatur. Bei den 3-Schritt-Protokollen (IL-1β und TNFα) wurden zuerst die Akzeptorbeads pipettiert und nach 30 min Inkubation wurden die AK hinzupipettiert. Darauf erfolgte eine Inkubationspause von 60 min. Nach der Pause wurden die Donorbeads hinzupipettiert und es folgte eine zweite Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

#### **3.7.3. Auswertung im Multifunktions-Mikroplatten-Reader**

Die Auswertung erfolgte im Photometer ClarioStar (III.1.2), einem Multifunktions-Mikroplatten-Reader. Die Platte wurde bei 615 nm ca. 50 s. lang gemessen. Aus den Duplikaten wurde der MW berechnet. Bei einer Abweichung zwischen den Einzelwerten jeder Probe von mehr als 20 % musste die Messung wiederholt werden. Die Werte, die unter der Nachweisgrenze lagen (für jede Platte) wurden nicht verwendet. Die untere Nachweisgrenze von IL-8 lag bei 0,213 pg/mL und die Quantifizierungsgrenze war 1,4 pg/mL. Die Quantifizierungsgrenze von IL-1β lag bei 1,6 pg/mL, bei IL-10 lag sie bei 4,6 pg/mL und bei TNFα lag sie bei 365 pg/mL.



### **3.8. Molekularbiologische Untersuchungen**

Zusätzlich zu der Untersuchung der Überstände (III.3.1, III.3.5, III.3.6 und III.3.7) wurden die Explants von den Hauptversuchen (Tiere 13-19) auf Transkriptionsebene getestet. Die Reverse Transkription (RT) mit folgender Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient dem Nachweis einer genspezifischen mRNA. Es ist dabei möglich einen quantitativen Nachweis mittels real time PCR (qRT-PCR) zu erhalten. Als Erstes erfolgte die RNA-Extraktion und –Qualitätsprüfung. Darauf erfolgte die *komplementäre* cDNA-Synthese und eine spätere qRT-PCR von fünf verschiedenen Genen: *CXCL8*, *IL-10*, *TNF*, *S100A9* und *LAP*.

#### **3.8.1. mRNA-Extraktion**

Die mit RNAlater<sup>®</sup> stabilisierten tiefgefrorenen Explants wurden am Tag der Extraktion auf Eis gelegt. In Lysetubes (III.2.6) mit Keramikbeads (2,4 - 2,8 mm) wurde 450 µL Lysepuffer (III.2.11.5) pro Röhrchen vorgelegt. Die Doppelansätze der Explants wurden *gepoolt* und zusammen in ein Lysetube mit Hilfe einer sterilen Pinzette überführt. Die Explants wurden mit einem Homogenisator „SpeedMill Plus“ (III.1.3) zerkleinert und aufgeschlossen. Für das Zerkleinern der Explants wurden zwei Zyklen á 2 min benötigt, mit einer einminütigen Kühlpause zwischen den beiden Zyklen. Nach der Homogenisierung erfolgte eine Zentrifugation (13.000 x g für 1 min), so dass die großen Gewebeanteile der Explants auf den Boden des Gefäßes sanken. Der klare Überstand wurde abpipettiert und auf eine Zentrifugationssäule pipettiert. Das Protokoll der Reinigung der RNA und Trennung der DNA erfolgte wie vom Hersteller in der Gebrauchsanweisung des „RNA Mini Kit“ (III.2.10) beschrieben. Sobald die RNA extrahiert war, wurde das Röhrchen auf Eis gelegt.

#### **3.8.2. mRNA-Qualitätsmessung**

Die RNA-Qualität wurde für alle Proben getestet. Dies erfolgte durch automatische Elektrophorese mittels eines Chips und einer automatisierten Elektrophorese-Station (Experion<sup>®</sup>, III.1.3). Für jede Probe wurde eine mittlere Konzentration und ein „*RNA quality indicator*“ (RQI)-Wert ermittelt. Der RQI-Wert entsteht aus einem Degradierungs-Standard, der von degradierter bis intakter RNA etabliert wird. Drei Bereiche des Elektropherogramms werden bei der Kartierung einer Probe für die RQI-Berechnungen berücksichtigt: die 28S-Region, die 18S-Region

und die Vor-18S-Region (vor der 18S-rRNA-Bande). Der RQI-Wert wird als ein Zahlenwert zwischen 1 und 10 aus Eukaryoten-RNA angegeben, wobei der Wert 10 für intakte RNA steht. Die Qualität wurde als „schlecht“ bezeichnet, wenn der RQI Wert zwischen 1 und 3,9 war; „mäßig“ wenn der Wert zwischen 4 und 6,9 lag, und als „gute“ Qualität, wenn der Wert  $> 7$  war. Während die Qualitätsbestimmung der RNA erfolgte, verblieb die restliche RNA für die cDNA Synthese auf Eis in einer Styroporbox bei 4°C.

### **3.8.3. cDNA Synthese durch Reverse Transkription**

Hierbei wurde zu jeder Probe 1 µL Oligo-(dt) Primer (III.2.10) pipettiert. Unmittelbar danach erfolgte eine Inkubation bei 70°C über 5 min. In dieser Zeit wurde der Mastermix (MM) zusammen pipettiert, nachdem die einzelnen Produkte aufgetaut (III.2.11.5) und gut durchmischt worden waren. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gelegt und 5 min abgekühlt. Anschließend wurde pro Probe 14 µL von dem MM hinzupipettiert, gemixt und zentrifugiert. Darauf erfolgte eine Inkubation im Thermocycler (III.1.3.), die aus drei Zyklen bestand, damit die Enzyme bei optimaler Temperatur arbeiten können: 10 min auf 38°C, dann 50 min auf 46°C und zum Schluss 15 min bei 70°C. Die cDNA wurde vor der Konzentrationsbestimmung auf Raumtemperatur gebracht.

### **3.8.4. cDNA-Konzentrations- und -Qualitäts-Bestimmung**

Bei jeder Probe der cDNA wurde die Konzentration und Qualität am Nanophotometer Pearl gemessen. Die Konzentration wurde bestimmt, indem die optische Dichte (OD) bei 260 nm mit 50 multipliziert wurde.

Es wurde 1 µL Probe für jede Messung verwendet. Die DNA-Quantität wurde in ng/mL bestimmt und anschließend dafür verwendet, um eine gewünschte Konzentration von 200 ng/mL in allen Proben zu erhalten. Die cDNA-Qualität wurde mittels Ratio A260/A280 bestimmt. Nukleinsäuren haben eine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Normalerweise steht eine Ratio von 1,8 für reine DNA. Je niedriger der Wert ist, desto unreiner wurde die cDNA Extraktion durchgeführt. Die cDNA Qualität wurde als sehr gut bezeichnet, wenn die Probe einen A260/A280 Ratio höher als 1,5 zeigte.

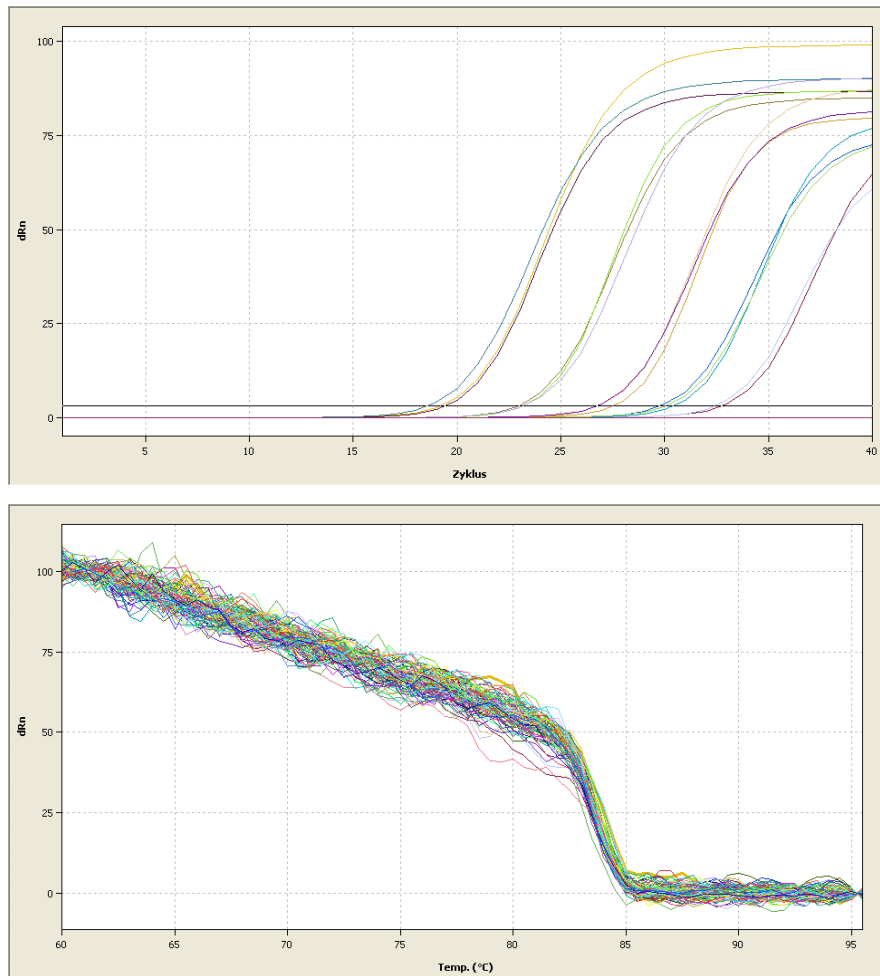
Nach der Beurteilung und Dokumentation der Werte wurden die Proben verdünnt, bei -20°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert. In dieser Form konnten sie

mehrere Monate aufbewahrt werden.

#### **3.8.5. Quantitative real time PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR wurde mit Standardkurven des Zielgens durchgeführt, sodass eine Quantifizierung der PCR-Produkte während der Amplifikationszyklen (in „Echtzeit“) stattfinden konnte.

Die qRT-PCR besteht aus der Wiederholung von drei Reaktionsschritten. Die doppelsträngige DNA wird im ersten Schritt aufgeschmolzen. Der zweite Schritt beinhaltet die Anlagerung der Primer an die DNA. Im letzten Schritt erfolgt die Verlängerung des DNA-Produkts (KUBISTA et al., 2006). Der Ablauf der drei Reaktionsschritte wird als Zyklus bezeichnet. Pro PCR-Lauf werden 40 Zyklen durchgeführt (Abbildung 8). Für die Quantifizierung der cDNA wird ein Farbstoff eingesetzt, in diesem Fall wurde SYBR Green verwendet. Der Farbstoff bindet an die doppelsträngige DNA und die Fluoreszenzintensität steht in einem direkten Verhältnis zur DNA-Menge. Nachdem die 40 Zyklen durchgeführt wurden, erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Durch die Erhöhung der Temperatur findet eine Denaturierung der Probe statt, in der die doppelsträngige DNA ab einer gewissen Temperatur zerfällt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Zyklen und Schmelzkurve einer qRT-PCR**

Exemplarische Darstellung eines Laufes und einer Schmelzkurve von CXCL8. Auf dem oberen Bild ist die Standardkurve in den Verdünnungen 102 bis 106 über 40 Zyklen dargestellt. In dem unteren Bild wurde eine Schmelzkurve von der Standardkurve und Proben dargestellt. Die Schmelztemperatur (Denaturierung) erfolgte bei ca. 83°C.

Die Kopienanzahl an DNA wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$MG = P \times 660 \text{ g/mol}$$

$$S [\text{Kopien}/\mu\text{L}] = \frac{6 \times 10^6 [\text{Kopien/mol}] \times \text{DNA} [\text{g}/\mu\text{L}]}{MG [\text{g/mol}]}$$

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>MG:</b>        | Molekulargewicht des PCR-Produkts                |
| <b>P:</b>         | PCR-Produktlänge in Basenpaaren                  |
| <b>S:</b>         | Standardkonzentration                            |
| <b>DNA:</b>       | im Photometer gemessene DNA-Konzentration        |
| <b>660 g/mol:</b> | Durchschnittliches molekulares Gewicht der Basen |

Lag die Standardabweichung des quantification cycle ( $C_q$ ) -Wert höher als 0,7, wurden diese Messungen wiederholt.

Die Standardkurve wurde hergestellt durch die Isolierung der gewünschten Genregion, der Implantation derselben in ein Plasmid und deren Isolation und Sequenzierung. Nach der Sequenzierung wurde dieses Gen verdünnt. Die Verdünnungstufen der Standardkurve entstehen aus der Konzentration  $10^2$  bis  $10^6$ .

Die Proben, die Standardkurven des verwendeten Genes und die Primer (III.2.12), wurden aufgetaut und im Heizblock bei  $60^\circ\text{C}$  über 5 min leicht gerüttelt (250 rpm) und homogenisiert. Anschließend wurden die DNA-haltigen Lösungen gerüttelt und kurz zentrifugiert.

In einem separaten Raum wurde der MM vorbereitet (III.2.11.5), zusammenpipettiert, gut gerüttelt und zentrifugiert.

Im PCR Labor wurden die benötigten Wells einer 96-Well-Platte mit 19  $\mu\text{L}$  des MM unter einer Werkbank befüllt. Zu jedem Well wurde 1  $\mu\text{L}$  von der jeweiligen Probe oder des Standards hinzupipettiert. Bei jeder Standardkurve gehörte eine NK oder NTC (RNA- und DNA-freies Wasser) im dreifachen Ansatz dazu. Alle Proben wurden immer im Doppelansatz pipettiert. Nachdem alle Wells befüllt waren, wurde die Platte mit einer transparenten Folie zugeklebt. Die Platte wurde ordentlich gerüttelt (bei 1.800 rpm für ca. 5 s) und zentrifugiert bei  $1.400 \times g$  für 5 min. Anschließend wurde die Platte in den Thermocycler gelegt und dieser so programmiert, dass ein erster Zyklus über 2 min bei  $95^\circ\text{C}$  erfolgte und dann 40 Wiederholungen von Zyklus 2 und 3 bei jeweils  $95^\circ\text{C}$  über 5 s und  $60^\circ\text{C}$  über 15 s. Die Fluoreszenz wurde immer nach Zyklus 3 gemessen. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte im Anschluss der qRT-PCR.

#### **3.8.6. Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse**

Der erste Schritt der Auswertung war die Analyse der Standardkurve. Die Dreifacheinsätze von jeder Verdünnungsstufe mussten im gleichen Bereich liegen (gleicher  $C_q$ -Wert) und die Standardabweichung des  $C_q$ -Werts niedriger als 0,7. Die NTC mussten negativ bleiben. Wenn die Werte der Standardkurve und die NTC die Anforderungen erfüllten, wurde die Effizienz der Standardkurve beurteilt. War diese zwischen 91-109 % und die Korrelation ( $R^2$ ) höher oder gleich 0,985, konnten

die Ergebnisse verwendet werden. Als Nächstes wurde die Schmelzkurve betrachtet. Pro Gen wurde die Schmelztemperatur dahingehend betrachtet, dass alle Proben und Standards im gleichen Temperaturbereich (°C) denaturierten.

Für jeden Messwert wird ein  $C_q$ -Wert angezeigt. Durch den Doppelansatz sind für jede Probe zwei  $C_q$ -Werte vorhanden aus denen ein MW mit entsprechender Standardabweichung berechnet wurde. Mit dem MW und den hinterlegten Konzentrationen der Standardkurve wurde die Konzentration der Probe in Kopien/ $\mu$ l berechnet.

#### *TNF*

Die Effizienz der Standardkurve lag zwischen 91 % und 96 %. Der  $R^2$  Wert lag höher als 0,985. Die Schmelztemperatur lag bei ca. 86°C.

#### *CXCL8*

Die Effizienz der Standardkurve lag zwischen 92 % und 97 %. Der  $R^2$  Wert lag höher als 0,99. Die Schmelztemperatur lag bei ca. 83°C.

#### *IL-10*

Die Effizienz der Standardkurve lag zwischen 96 % und 97 %. Der  $R^2$  Wert lag höher als 0,99. Die Schmelztemperatur lag bei ca. 84°C.

#### *S100A9*

Die Effizienz der Standardkurve lag zwischen 95 % und 109 %. Der  $R^2$  Wert lag höher als 0,985. Die Schmelztemperatur lag bei ca. 82°C.

#### *LAP*

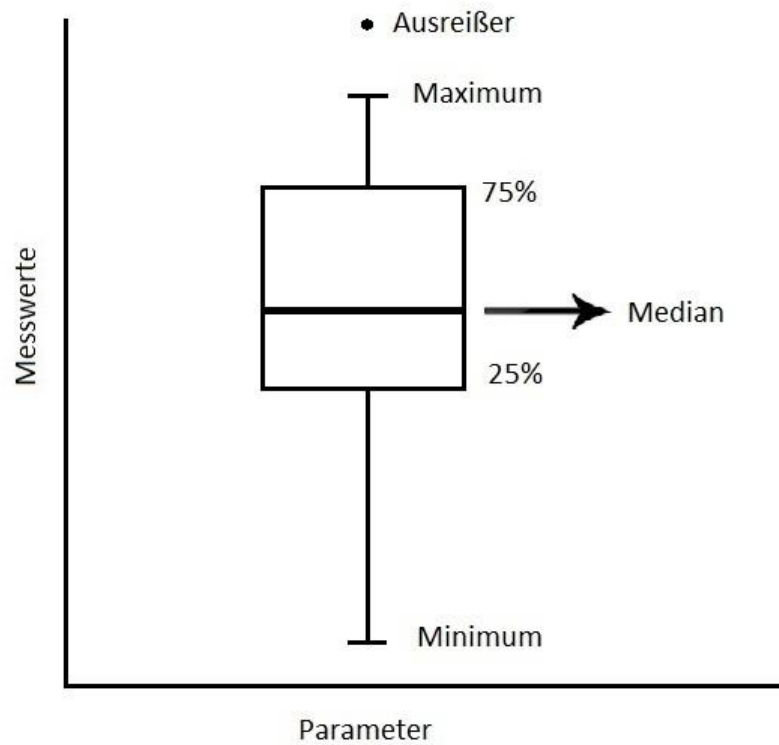
Die Effizienz der Standardkurve lag zwischen 98 % und 104 %. Der  $R^2$  Wert lag höher als 0,985. Die Schmelztemperatur lag bei ca. 85°C.

### **3.9. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde das Programm „R“, Version 3.2.3, verwendet. Um zu testen, ob Daten normalverteilt sind, wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Sofern die Daten normalverteilt waren, wurde ein t-Test verwendet; bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei einem Vergleich normalverteilter gegen nicht normalverteilte Daten wurde der robustere Test benutzt, in diesem Fall der Mann-Whitney-U-Test. Die Ergebnisse wurden als signifikant bezeichnet, wenn der P-Wert  $< 0.05$  war. Bei den PCR-Ergebnissen hatten die Doppelansätze zwar unterschiedliche  $C_q$ -Werte, die jedoch gemittelt wurden. Um Doppelwerte in der Statistik zu vermeiden um nur einzelne Daten zu bekommen (weil sie immer zum gleichen Ansatz gehörten), wurden diese Werte für die Berechnung der Statistik eliminiert.

Die Ermittlung von Mittelwerten erfolgte durch Microsoft Excel™ (Microsoft Inc., USA).

In der deskriptiven Statistik wurden die Daten durch Graphen mit dem Programm GraphPad Prism (Version 7, GraphPad Software, Inc, USA) dargestellt. Bei der Migrationsrate,  $Ca^{2+}$ -Influx sowie bei den AlphaLISA®-Ergebnissen und den cDNA-Konzentrationen, wurden die Daten mittels Boxplots dargestellt. Dank dieser Darstellung erkennt man sofort den Minimal- und Maximalwert, die Ausreißer sowie den Median und das 1. Quartil und 3. Quartil (Abbildung 9). Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: \* = P-Wert zwischen 0,05 und 0,01; \*\* = P-Wert zwischen 0,01 und 0,001; \*\*\* = P-Wert  $< 0,001$ .



**Abbildung 9: Beispiel der Darstellung von Daten in einem Boxplot**

*Die zentralen 50 % der Daten befinden sich in der Box, in der der Median durch eine horizontale Linie gezeichnet ist.*



## IV. ERGEBNISSE

### 1. Methylierungs- und Acetylierungsmuster in PMN aus Blut und Milch

Die Aktivierung von PMN, und somit die Veränderung des epigenetischen Musters, findet größtenteils im Zielgewebe statt. Eine Fragestellung dieser Arbeit war es, Veränderungen des Methylierungs- und Acetylierungsmusters von PMN nach dem Überschreiten der Blut-Euter-Schranke zu untersuchen. Dies sollte erste Hinweise liefern, ob epigenetisch wirksame Mechanismen an der veränderten Funktionalität von Milch- gegenüber Blut-PMN beteiligt sind. Für die Untersuchung des Musters im Zellkern wurde eine ICIF-Färbung durchgeführt (III.3.2).

#### 1.1. Zytobakteriologische Befunde in der Milch

Bei drei Kühen mit klinischer Mastitis wurden Milchproben gewonnen (III.2.13.1). Zur Identifikation der Mastitiserreger wurden diese Milchproben einer bakteriologischen Untersuchung unterzogen. Zusätzlich wurde ein CMT durchgeführt und die genaue Zellzahl mittels DCC Zellzahlmessgerät (III.1.1) bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei den drei untersuchten Kühen jeweils ein unterschiedlicher Erreger in der Milch nachzuweisen war (Tabelle 6). Der CMT fiel deutlich (++-, Tier 151) bis stark positiv (+++, Tier 238 und Tier 123) aus und deckte sich mit den ermittelten Zellzahl-Befunden (Tabelle 6).

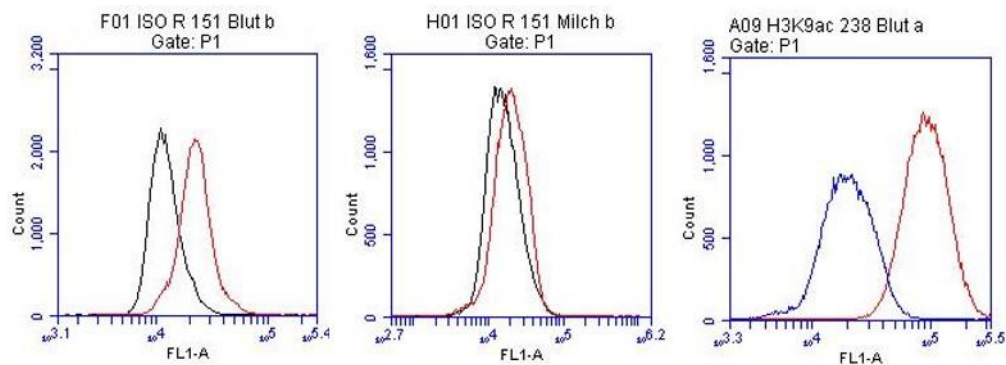
**Tabelle 6: Zellzahl und bakteriologischer Befund aus der Milch der Spendertiere zur Untersuchung von Methylierungs- und Acetylierungsmustern von PMN**

| <i>Tier-Nr.</i> | <i>Euterviertel</i> | <i>Zellzahl (*10<sup>3</sup>/mL)</i> | <i>Bakteriologischer Befund</i> |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 123             | HL                  | 1.928                                | <i>Staphylococcus</i> spp.      |
| 151             | VR                  | 821                                  | <i>Staphylococcus aureus</i>    |
| 238             | HL                  | 3.154                                | Koliforme                       |

*HL* = hinten links; *VR* = vorne rechts.

## 1.2. Vergleich des Methylierungs- und Acetylierungsmusters in PMN aus Blut und Milch

Die PMN aus Blut und Milch wiesen leichte Unterschiede hinsichtlich ihres Methylierungs- und Acetylierungsmusters auf. Milch-PMN zeigten eine geringere Fluoreszenzintensität für H3K9ac als Blut-PMN (Abbildung 10). Dieser Unterschied trat noch deutlicher hervor, wenn die Fluoreszenzintensität für H3K9ac von Blut- und Milch-PMN direkt nebeneinander dargestellt wurde.

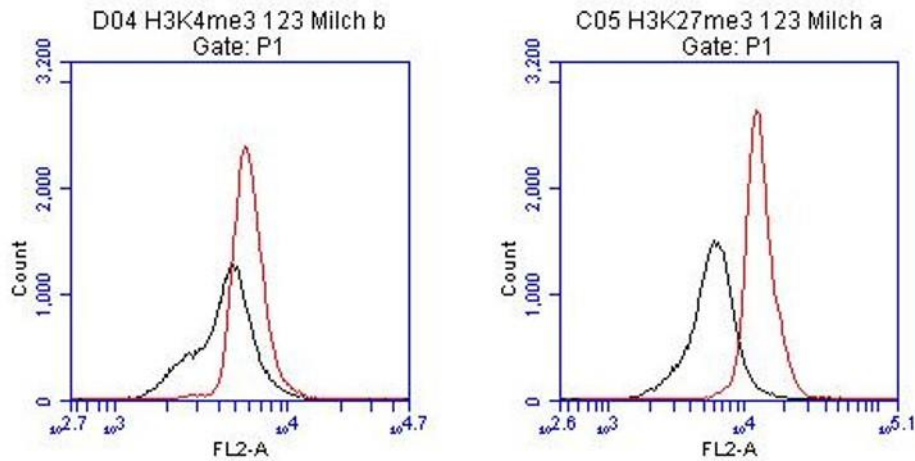


**Abbildung 10: Fluoreszenzintensität der Histon-Region H3K9ac in PMN aus Blut und Milch**

Dargestellt als Histogramm ist die Fluoreszenzintensität (FL1-A = Grünfluoreszenz), gegen die Anzahl an PMN (Count). Linkes Fenster: Blut-PMN. Mittleres Fenster: Milch-PMN. Rot: Färbung mittels H3K9ac-spezifischem Antikörper. Schwarz: Negativkontrolle (ISO R). Rechtes Fenster: Färbung mittels H3K9ac-spezifischem Antikörper in Blut (rot) und in Milch (blau).

Es zeigte sich jedoch auch, dass die beobachteten Unterschiede abhängig vom Individuum und vom Tag der Probenentnahme z.T. erheblich abwichen (Tabelle 6). Somit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Acetylierungsmuster zwischen Blut- und Milch-PMN herausgearbeitet werden.

Im Gegensatz zur Acetylierung, gab es kein konstantes Muster von Blut- und Milch-PMN hinsichtlich der Methylierung der Histon-Regionen H3K4me<sub>3</sub> und H3K27me<sub>3</sub>. Die mittlere Fluoreszenzintensität schwankte zwischen Probanden und Proben Tagen, unabhängig davon, ob die PMN aus Blut oder Milch isoliert worden waren (Abbildung 11 und Tabelle 7).



**Abbildung 11: Fluoreszenzintensität der Histon-Region H3K4me<sub>3</sub> und K3K27me<sub>3</sub> in PMN aus Milch**

Dargestellt als Histogramm ist die Fluoreszenzintensität (FL2-A = Orangefluoreszenz), gegen die Anzahl an Milch-PMN (Count). Rot: Färbung mittels H3K4me<sub>3</sub>-spezifischem Antikörper (links) und K3K27me<sub>3</sub>-spezifischem Antikörper (rechts). Schwarz: Negativkontrolle (ISO R).

In Tabelle 7 werden die Unterschiede pro Tier und Region zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 7: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Histon-Regionen H3K9ac, H3K4me<sub>3</sub> und K3K27me<sub>3</sub> in Blut- und Milch-PMN**

| Tier Nr. | Woche | MFI H3K9 ac |        | MFI H3K4 me <sub>3</sub> |        | MFI H3K27 me <sub>3</sub> |        |
|----------|-------|-------------|--------|--------------------------|--------|---------------------------|--------|
|          |       | Blut        | Milch  | Blut                     | Milch  | Blut                      | Milch  |
| 123      | 1     | 96.121      | 30.065 | 7.174                    | 4.976  | 14.320                    | 6.629  |
|          | 2     | 90.482      | 61.094 | 5.441                    | 4.747  | 5.922                     | 5.332  |
|          | 3     | 81.002      | 80.836 | 4.567                    | 4.401  | 4.763                     | 4.712  |
| 151      | 1     | 24.342      | 22.543 | 5.942                    | 10.483 | 8.769                     | 7.524  |
|          | 2     | 77.550      | 66.585 | 6.490                    | 6.067  | 17.792                    | 13.716 |
|          | 3     | 93.042      | 64.519 | 3.508                    | 3.696  | 4.572                     | 5.578  |
| 238      | 1     | 95.745      | 21.017 | 6.486                    | 23.859 | 9.971                     | 12.270 |
|          | 2     | 88.607      | 35.880 | 5.365                    | 5.153  | 11.858                    | 8.222  |
|          | 3     | 81.472      | 71.026 | 5.231                    | 4.567  | 5.104                     | 4.847  |

MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

### 1.3. Vergleich des Methylierungs- und Acetylierungsmusters in PMN vor und nach aktiver Migration *in vitro*

Die Ergebnisse aus Abschnitt IV.1.2 wiesen darauf hin, dass es Unterschiede zwischen dem Acetylierungsmuster von Blut und Milch-PMN gibt. Um zu analysieren, ob die Unterschiede auf die aktive Wanderung der PMN zurückzuführen sind, wurden Blut-PMN untersucht, die aktiv durch eine Membran

gewandert waren (III.3.5.3).

Die Untersuchung ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des Methylierungs- ( $H3K4me_3$  und  $H3K27me_3$ ) und Acetylierungsmusters ( $H3K9ac$ ) zwischen den durch eine Polycarbonatmembran gewanderten PMN und den nicht gewanderten PMN (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Histon-Regionen  $H3K9ac$ ,  $H3K4me_3$  und  $H3K27me_3$  migrierter und nicht-migrierter Blut-PMN**

| <i>Tier</i> | <i>H3K9ac</i>  |                | <i>H3K4me<sub>3</sub></i> |               | <i>H3K27me<sub>3</sub></i> |               |
|-------------|----------------|----------------|---------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
|             | <b>OW</b>      | <b>UW</b>      | <b>OW</b>                 | <b>UW</b>     | <b>OW</b>                  | <b>UW</b>     |
| 158         | 122.606        | 137.351        | 9.602                     | 9.729         | 22.055                     | 24.734        |
|             | 104.080        | 107.207        | 9.418                     | 8.674         | 19.354                     | 22.643        |
| 274         | 123.776        | 127.997        | 12.039                    | 12.868        | 31.741                     | 28.501        |
|             | 108.029        | 112.994        | 12.328                    | 12.909        | 27.312                     | 28.586        |
| 299         | 130.016        | 155.950        | 8.893                     | 9.239         | 24.636                     | 26.684        |
|             | 105.517        | 134.463        | 8.957                     | 9.150         | 20.599                     | 20.111        |
| <b>MW</b>   | <b>115.670</b> | <b>129.327</b> | <b>10.206</b>             | <b>10.428</b> | <b>24.283</b>              | <b>25.210</b> |

*OW* = oberes Well (nicht gewandert); *UW* = unteres Well (aktiv gewandert); *MW* = Mittelwert.

## 2. Einfluss epigenetisch wirksamer Immunmodulatoren auf die Pathogen-Wirt-Interaktion in mammärem Gewebe

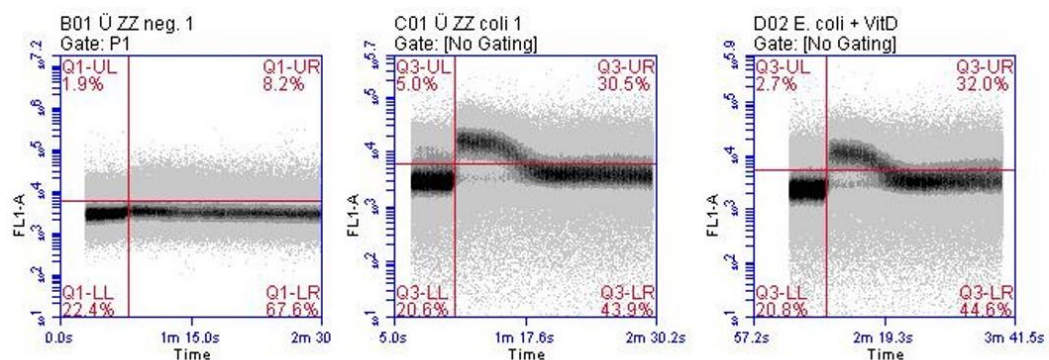
Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren VitD<sub>3</sub>, SAHA und S2101 auf die Pathogen-Wirt-Interaktion in Zitzen- und Eutergewebe zu untersuchen.

### 2.1. Einfluss von VitD<sub>3</sub>

Nach der Inkubation stimulierter und nicht stimulierter Explants mit und ohne Zusatz von VitD<sub>3</sub> (III.3.3.4) wurden die Überstände auf Funktionalität (Chemotaxis, III.3.5) und Aktivierung von PMN über den Ca<sup>2+</sup>-Influx (Fluo-4 –Färbung, III.3.6) getestet.

Die Stimulation der Euter-Explants mit *S. aureus* und *E. coli* führte zur 17- bis 20-fachen Steigerung der chemotaktischen Potenz ihrer Überstände. Es konnte jedoch kein Einfluss von VitD<sub>3</sub> auf die Produktion chemotaktischer Substanzen festgestellt werden (Tabelle 9).

Die Messung des Ca<sup>2+</sup>-Influx in PMN erbrachte ein vergleichbares Ergebnis: die Überstände stimulierter Euter- und Zitzenexplants führte zu einem verstärkten Ca<sup>2+</sup>-Influx in PMN (Abbildung 12). Der Zusatz von VitD<sub>3</sub> im Medium der Explants hatte keinen Einfluss auf den Ca<sup>2+</sup>-Influx (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Einfluss von VitD<sub>3</sub> auf den Calcium-Influx von PMN**

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (FL1-A = Grünfluoreszenz), gegen die Zeit (Time). Die Überstände von Explants der Zitzenzisterne wurden 20 s nach Messbeginn zu der PMN-Suspension hinzupipettiert. Links: Überstand eines nicht stimulierten Explants. Mitte: Überstand eines *E. coli*-stimulierten Explants. Rechts: Überstand eines in Gegenwart von VitD<sub>3</sub> und *E. coli*-stimulierten Explants.

**Tabelle 9: Relative Migrationsraten (MW±SD) von PMN auf *E.-coli*- und *S.-aureus*-stimulierte und nicht stimulierte Explantkulturüberstände mit und ohne Zusatz von VitD<sub>3</sub> (n = 6)**

| Tier      | Kontrolle   |             | VitD <sub>3</sub> |             | <i>EC</i>    |              | <i>EC</i> + VitD <sub>3</sub> |              | <i>SA</i>    |              | <i>SA</i> + VitD <sub>3</sub> |              |
|-----------|-------------|-------------|-------------------|-------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|
|           | MW          | SD          | MW                | SD          | MW           | SD           | MW                            | SD           | MW           | SD           | MW                            | SD           |
| 1         | 2,53        | 1,91        | 9,97              | 11,09       | 84,21        | 9,54         | 85,96                         | 11,28        | 85,04        | 4,95         | 83,48                         | 3,13         |
| 2         | 0,18        | 0,22        | 0,21              | 0,12        | 71,48        | 6,34         | 61,68                         | 17,09        | 36,64        | 33,6         | 40,44                         | 34,4         |
| 5         | 0,29        | 0,15        | 0,37              | 0,15        | 71,03        | 12,32        | 67,48                         | 6,84         | 60,09        | 12,7         | 63,23                         | 10,07        |
| 6         | 2,76        | 0,62        | 5,55              | 0,49        | 78,43        | 9,3          | 78,92                         | 5,66         | 84,43        | 5,21         | 84,95                         | 7,5          |
| 7         | 18,49       | 2,33        | 18,72             | 4,09        | 74,75        | 3,58         | 75,54                         | 2,94         | 59,27        | 2,13         | 59,41                         | 8,61         |
| 8         | 5,37        | 3,09        | 12                | 8,52        | 76,95        | 8,93         | 77,71                         | 14,54        | 80,57        | 10,61        | 58,51                         | 26,89        |
| <b>GE</b> | <b>3,77</b> | <b>5,82</b> | <b>8,6</b>        | <b>9,03</b> | <b>76,24</b> | <b>10,01</b> | <b>74,86</b>                  | <b>13,72</b> | <b>66,84</b> | <b>24,48</b> | <b>63,68</b>                  | <b>25,12</b> |

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; EC=E. coli; SA=S. aureus; GE=Gesamt Ergebnis.

Da die Inkubation der Explants mit VitD<sub>3</sub> keinen messbaren Effekt zeigte, wurden keine weiteren Untersuchungen mit diesen Überständen durchgeführt.

## **2.2. Einfluss von SAHA und S2101**

Nach der Inkubation der mammären Explants mit und ohne Zusatz der epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren SAHA und S2101 (III.3.3.4) wurden die Überstände zunächst mittels Chemotaxisassay auf Funktionalität getestet (III.3.5).

Der Zusatz von SAHA und S2101 bei vergleichsweise niedrigeren Konzentrationen (Versuch 3 und 4, III.3.3.1.2) hatte keinen Einfluss auf die Produktion von chemotaktischen Faktoren. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen mit vergleichbaren niedrigen Konzentrationen durchgeführt.

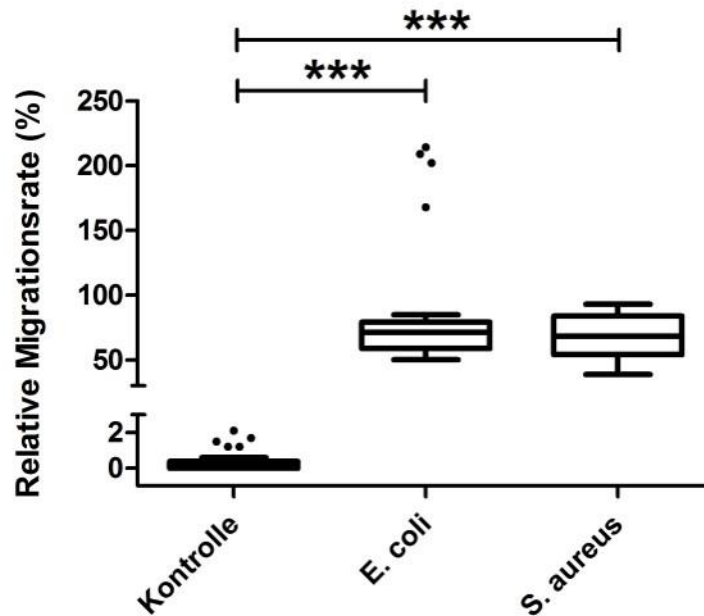
Nachfolgend werden ausschließlich die Ergebnisse der Versuche 5 bis 8 betrachtet, in dem ein Effekt mit höher gewählten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Mit den Überständen der Explants wurde ein Chemotaxisassay und anschließend eine Fluo-4 Färbung (III.3.6) durchgeführt. Mittels AlphaLISA® wurde die Konzentration verschiedener Zytokine im Überstand bestimmt (III.3.7). Die Explants wurden nach erfolgter Inkubation molekularbiologisch hinsichtlich Transkriptabundanzen von Zytokinen, Chemokinen und AMP untersucht (III.3.8).

### **2.2.1. SAHA und S2101 hemmen die Bildung chemotaktischer Faktoren in mammären Explants**

Mittels Chemotaxisassay sollte überprüft werden, ob SAHA und S2101 einen Einfluss auf die Produktion chemotaktischer Faktoren durch Explants nach Pathogen-Kontakt haben. Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte am Durchflusszytometer.

*Die Interaktion mit Mastitis-Pathogenen führt invariant zur Bildung chemotaktischer Faktoren in der Zitzenzisterne und im Euterparenchym*

Im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle führte die Koinkubation von mammären Explants mit *E. coli* und *S. aureus* hoch signifikant zur Steigerung ( $P = 1,18 \cdot 10^{-10}$ ) chemotaktischer Faktoren (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Relative Migrationsrate von PMN auf Kulturüberstände von Explants aus der Zitzenzisterne**

Dargestellt als Boxplot sind die relativen Migrationsraten (bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle von 100 ng/mL IL-8). Die Explants wurden entweder mit  $10^8$ /mL CFU *E. coli* oder *S. aureus* stimuliert oder wurden nicht stimuliert (Kontrolle). Anzahl der Ansätze jeweils  $n = 7$ . Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \*\*\* =  $P < 0,001$ .

*Die konstitutive Bildung chemotaktischer Faktoren ist höher im Euterparenchym als in der Zitzenzisterne*

Die chemotaktische Potenz der Explants unterschied sich zwischen den Lokalisationen: Die Überstände der Explants aus dem EP lockten signifikant mehr PMN als die Überstände der Explants aus der ZZ (Tabelle 10). Am deutlichsten war dies bei Überständen nicht stimulierter Explants zu konstatieren.



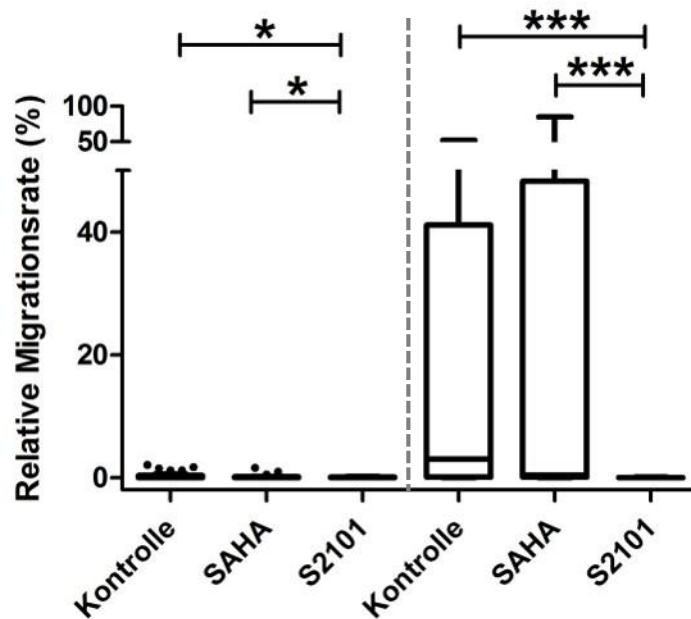
**Tabelle 10: Einfluss von SAHA und S2101 auf die Migrationrate von PMN auf Überstände stimulierter und nicht stimulierter Explants aus Euterparenchym und Zitzenzysterne**

|          | ZZ    |   |      | EP    |   |      |
|----------|-------|---|------|-------|---|------|
|          | MW    |   | SD   | MW    |   | SD   |
| Ø        | 0,38  | ± | 0,6  | 14,18 | ± | 20,0 |
| SAHA     | 0,2   | ± | 0,3  | 18,79 | ± | 29,6 |
| S2101    | 0,06  | ± | 0,1  | 0,03  | ± | 0,0  |
| EC       | 85,88 | ± | 48,2 | 85,74 | ± | 20,5 |
| EC+SAHA  | 74,81 | ± | 47,0 | 71,36 | ± | 26,1 |
| EC+S2101 | 31,04 | ± | 23,2 | 42,31 | ± | 28,5 |
| SA       | 68,88 | ± | 16,5 | 70,48 | ± | 27,5 |
| SA+SAHA  | 52,08 | ± | 29,7 | 35,13 | ± | 39,1 |
| SA+S2101 | 10,54 | ± | 10,9 | 16,58 | ± | 28,4 |

Dargestellt ist die relative Migrationsrate ( $MW \pm SD$ ) von PMN; Anzahl der Ansätze jeweils  $n = 7$  ZZ = Zitzenzysterne; EP = Euterparenchym; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Ø = nicht stimuliert; SAHA = 13,21 µg/mL; S2101 = 1,56 µg/mL EC =  $10^8$  E. coli/mL, hitzeinaktiviert; SA =  $10^8$  S. aureus/mL, hitzeinaktiviert.

*S2101 aber nicht SAHA hemmen die konstitutive Bildung chemotaktischer Faktoren in mammären Explants*

Sowohl bei Explants der ZZ, als auch bei Explants des EP konnte gezeigt werden, dass S2101 die konstitutive Bildung chemotaktischer Faktoren signifikant hemmte (Abbildung 14). Für SAHA konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden.

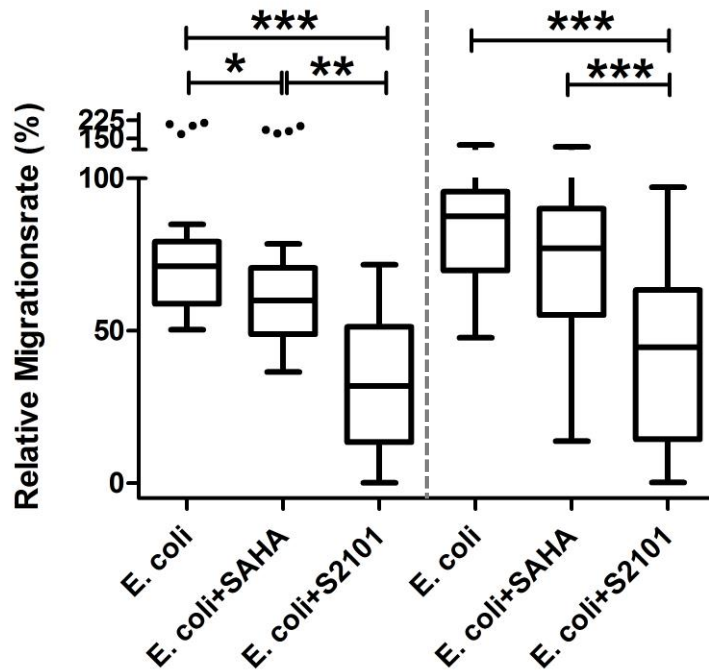


**Abbildung 14: Einfluss von SAHA und S2101 auf die relative Migrationsrate von PMN auf Kulturüberstände nicht-stimulierter Explants**

Dargestellt als Boxplot sind die relativen Migrationsraten (bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle von 100 ng/mL IL-8). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

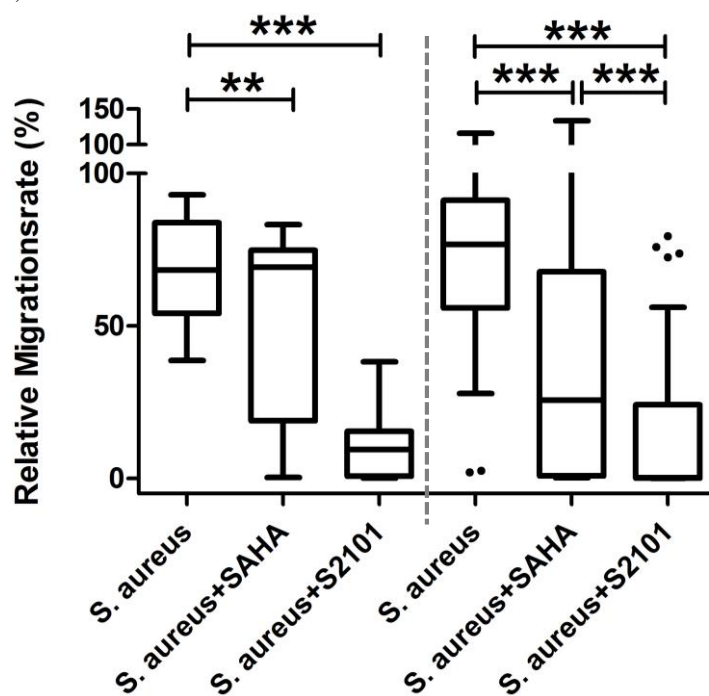
*S2101 hemmt stärker die Pathogen-induzierte Bildung chemotaktischer Faktoren in mammären Explants als SAHA*

Die Minderung der relativen Migrationsraten nach *E.-coli*-Stimulation war statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ) wenn Explants der ZZ in Anwesenheit von SAHA kultiviert wurden (Abbildung 15). Bei den Explants die vom EP stammten konnte ein statistisch signifikanter Unterschied durch die Anwesenheit von SAHA nach *S.-aureus*-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 16). Der MW der Minderung der Migrationsrate bei dem Ansatz von SAHA mit *E. coli* im Gegensatz zu *E. coli* alleine betrug 11,1 % in der ZZ und 14,4 % im EP ( $P = 0,015$ ). Bei der Anwesenheit von SAHA während der *S.-aureus*-Stimulation im Gegensatz zum Ansatz ohne SAHA lag die Minderung bei 16,8 % in der ZZ und 35,3 % im EP ( $P = 0,00023$ ).



**Abbildung 15: Einfluss von SAHA und S2101 auf die relative Migrationsrate von PMN auf Kulturüberstände *E.-coli*-stimulierter Explants**

Dargestellt als Boxplot sind die relativen Migrationsraten (bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle von 100 ng/mL IL-8). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



**Abbildung 16: Einfluss von SAHA und S2101 auf die relative Migrationsrate von PMN auf Kulturüberstände *S.-aureus*-stimulierter Explants**

Dargestellt als Boxplot sind die relativen Migrationsraten (bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle von 100 ng/mL IL-8). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

Der Zusatz von S2101 hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die aktive Wanderung der PMN im Chemotaxisassay. Dieser Effekt zeigte sich bereits in Abwesenheit von Bakterien bei den Explants aus der ZZ ( $P < 0,05$ , Abbildung 14) und noch stärker ( $P < 0,01$ ) im Bereich der ZZ und des EP bei der Anwesenheit von Bakterien (Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Reduktion durch S2101 der durch *E. coli* induzierten Migrationsrate betrug 54,8 % in der ZZ ( $P = 2,9 \cdot 10^{-9}$ ) und 43,4 % im EP ( $P = 1 \cdot 10^{-6}$ ). SAHA reduzierte die durch *S. aureus* induzierte Migrationsrate um 58,3 % in den Explants aus der ZZ ( $P = 1,39 \cdot 10^{-10}$ ) und 53,9 % in Explants aus dem EP ( $P = 1,86 \cdot 10^{-5}$ ).

### 2.2.2. Einfluss von SAHA und S2101 auf die Produktion PMN-aktivierender Faktoren in mammären Explants

Die Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in bovinen PMN wurde mittels des fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fluo-4 nach Stimulation *in vitro* durchflusszytometrisch erfasst (III.3.6).

Es gab keinen direkten Einfluss von SAHA oder S2101 auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in PMN (Daten nicht gezeigt). Somit wurde bei der Auswertung als Kontrolle nur der Kulturüberstand nicht stimulierter Explants herangezogen. Zwischen der Kontrolle und den Überständen die nur mit SAHA und S2101 inkubiert wurden gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Im Gegensatz zum Chemotaxisassay, zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Lokalisationen ZZ und EP (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Relative Calcium-Strömungsrate in PMN nach Stimulation mit Überständen von mammären Explants, die in Anwesenheit von SAHA und S2101 kultiviert wurden**

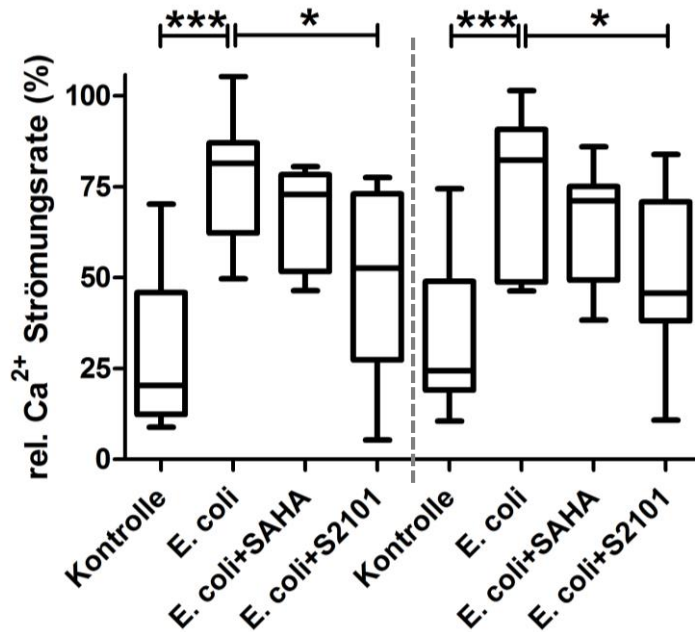
|           | Kontrolle | EC      | EC+SAHA | EC+S2101 | SA      | SA+SAHA | SA+S2101 |
|-----------|-----------|---------|---------|----------|---------|---------|----------|
| <b>ZZ</b> | 38,49 %   | 78,93 % | 69,69 % | 53,82 %  | 71,77 % | 54,91 % | 42,88 %  |
| <b>EP</b> | 32,99 %   | 78,35 % | 66,48 % | 54,49 %  | 58,29 % | 39,80 % | 35,05 %  |

Die relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömungsrate ist bezogen auf die Positivkontrolle (IL-8 = 100 %). ZZ = Zitzenzisterne; EP = Euterparenchym; EC = *E. coli*; SA = *S. aureus*.

*S2101 aber nicht SAHA hemmen die Pathogen-induzierte Bildung von Faktoren in mammären Explants, die zum Calcium-Influx in PMN führen*

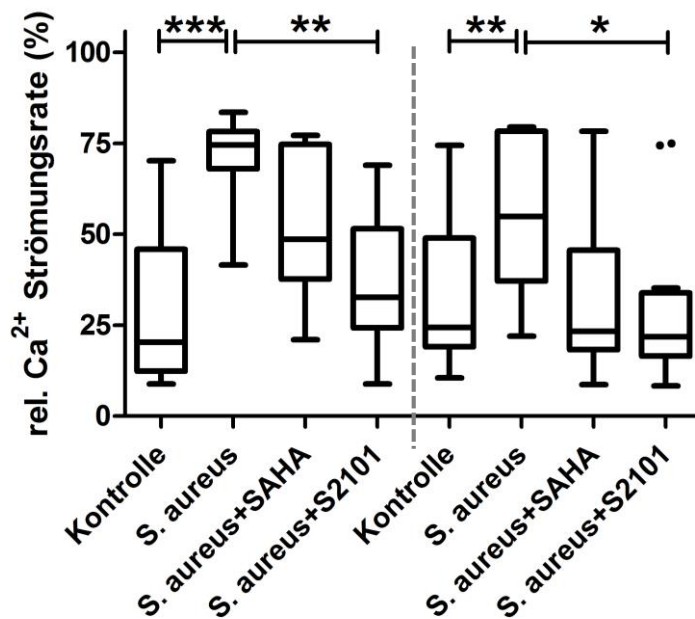
Vergleichbar zum Chemotaxisassay zeigte sich, dass S2101 sowohl in der ZZ als auch beim EP die Bildung PMN-aktivierender Faktoren hemmte. Die relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömungsrate in PMN wurde statistisch signifikant reduziert. Für SAHA konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Die Inkubation von Explants der ZZ und EP mit *E. coli* führte zur hoch signifikant gesteigerten Produktion PMN-aktivierender Faktoren (ZZ  $P = 1,2 \cdot 10^{-4}$ , EP  $P = 2,7 \cdot 10^{-5}$ ). Bei Anwesenheit von S2101 wurde diese Produktion signifikant in der ZZ ( $P = 0,017$ ) sowie im EP ( $P = 0,012$ ) gehemmt (Abbildung 17). Beim EP wurde in Tendenz eine reduzierte relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömungsrate in Gegenwart von SAHA beobachtet ( $p = 0,068$ ). Auch die Inkubation von Explants der ZZ und EP mit *S. aureus* führte zur hoch signifikant gesteigerten Produktion PMN-aktivierender Faktoren (ZZ  $P = 6,8 \cdot 10^{-5}$ , EP  $P = 0,0019$ ). Bei den Ansätzen mit S2101 wurde die Produktion in der ZZ ( $P = 0,0013$ ) und im EP ( $P = 0,024$ ) signifikant minimiert (Abbildung 18). Bei dem Ansatz mit SAHA war im Bereich der ZZ eine tendenziell eine Reduktion zu beobachten ( $P = 0,057$ ).



**Abbildung 17: Relative Calcium-Strömungsrate in PMN nach Stimulation mit Überständen *E.-coli*-stimulierter mammärer Explants, die in Anwesenheit von SAHA und S2101 kultiviert wurden**

Die relative  $Ca^{2+}$ -Strömungsrate ist bezogen auf die Positivkontrolle (IL-8 = 100 %). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



**Abbildung 18: Relative Calcium-Strömungsrate in PMN nach Stimulation mit Überständen *S.-aureus*-stimulierter mammärer Explants, die in Anwesenheit von SAHA und S2101 kultiviert wurden**

Die relative  $Ca^{2+}$ -Strömungsrate ist bezogen auf die Positivkontrolle (IL-8 = 100 %). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

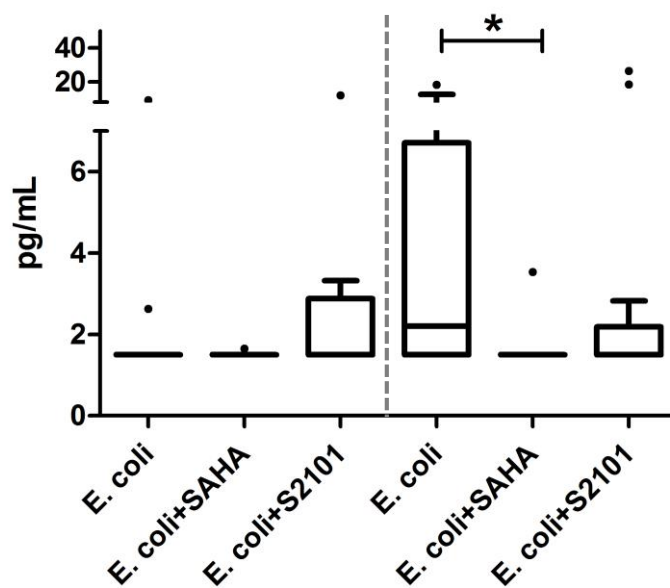
### 2.2.3. Produktnachweis in Überständen mammärer Explante mittels AlphaLISA®

Der Nachweis auf Proteinebene mittels AlphaLISA® sollte zum einen die funktionellen Daten des Chemotaxisassays und der Fluo-4 Färbung untermauern und zum anderen die Translation von inflammatorisch relevanten Zytokinen aufzeigen.

#### IL-1 $\beta$

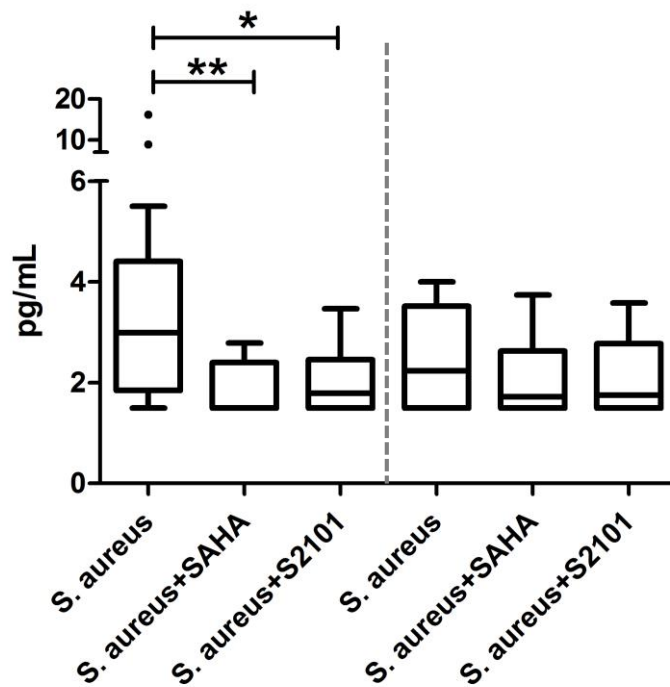
Sowohl in Überständen der ZZ als auch des EP wurde bei den Ansätzen ohne Zusatz von Bakterien kein Einfluss von SAHA oder S2101 auf die Konzentration von IL-1 $\beta$  beobachtet ( $P > 0,05$ ). Die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  lagen stets unterhalb der Quantifizierungsgrenze, so dass keine Unterschiede erfasst werden konnten.

In Gegenwart von *E. coli* wurde eine Hemmung der IL-1 $\beta$ -Produktion im EP unter Einfluss von SAHA beobachtet ( $P = 0,013$ ) (Abbildung 19). Bei den Ansätzen mit *S. aureus* führte sowohl SAHA ( $P = 0,0044$ ) als auch S2101 ( $P = 0,024$ ) zu einer signifikanten Reduktion von IL-1 $\beta$  in Überständen der ZZ (Abbildung 20).



**Abbildung 19: Konzentration von IL-1 $\beta$  im Überstand *E.-coli*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von IL-1 $\beta$  in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05$  -  $0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01$  -  $0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



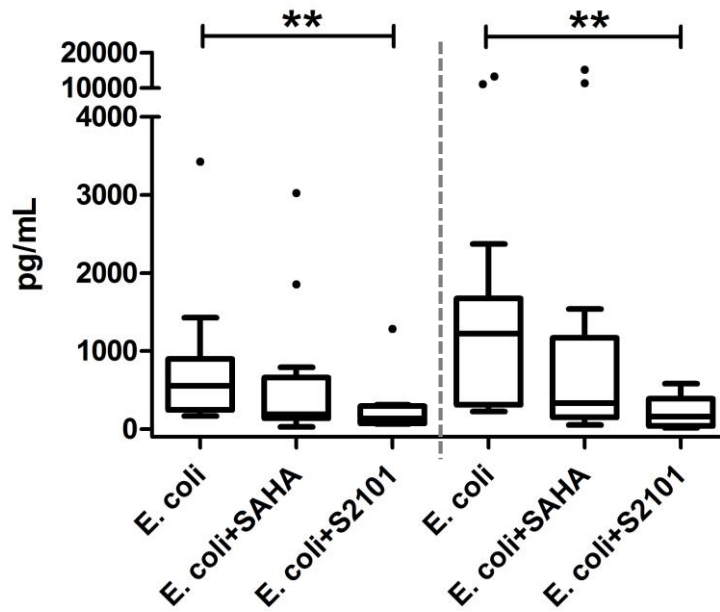
**Abbildung 20: Konzentration von IL-1 $\beta$  im Überstand *S.-aureus*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von IL-1 $\beta$  in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

### IL-8

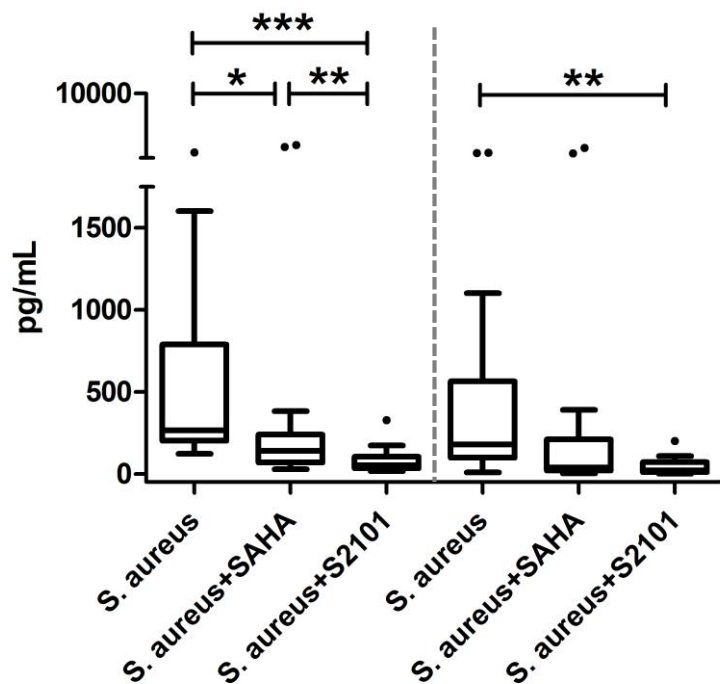
S2101 zeigte einen mittleren bis starken Einfluss auf die IL-8-Produktion nach Pathogenkontakt. Die Konzentration von IL-8 wurde durch S2101 statistisch signifikant bei dem Ansatz mit *E. coli* in der ZZ ( $P = 0,0029$ ) und im EP ( $P = 0,0029$ ) gehemmt (Abbildung 21). Ähnlich zeigte sich die Situation nach *S.-aureus*-Stimulation der ZZ ( $P = 6,9 \cdot 10^{-7}$ ) und des EP ( $P = 0,0014$ , Abbildung 22). SAHA induzierte in der ZZ tendenziell eine leichte Abnahme der Produktion von IL-8 nach *E.-coli*-Stimulation ( $P = 0,062$ ) und eine signifikante Abnahme nach *S.-aureus*-Stimulation ( $P = 0,027$ ).





**Abbildung 21: Konzentration von IL-8 im Überstand *E.-coli*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von IL-8 in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:  $*$  =  $P < 0,05 - 0,01$ ;  $**$  =  $P < 0,01 - 0,001$ ;  $***$  =  $P < 0,001$ .



**Abbildung 22: Konzentration von IL-8 im Überstand *S.-aureus*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

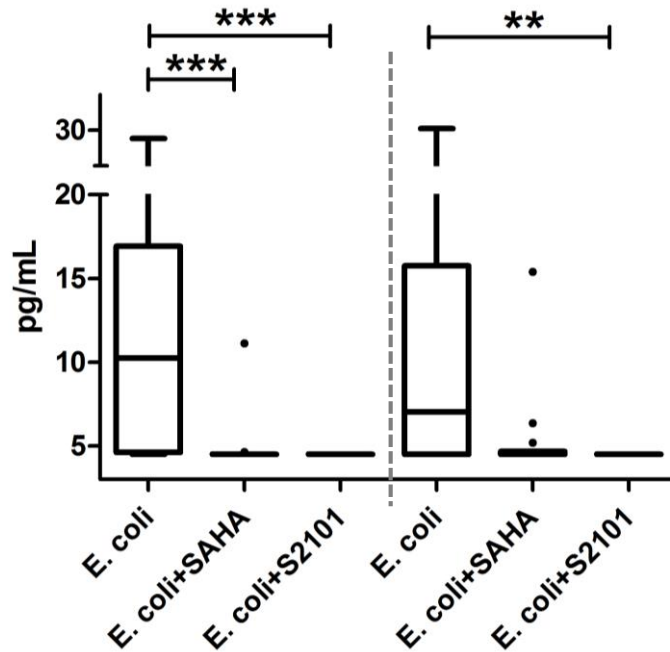
Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von IL-8 in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:  $*$  =  $P < 0,05 - 0,01$ ;  $**$  =  $P < 0,01 - 0,001$ ;  $***$  =  $P < 0,001$ .

### *IL-10*

Bei den Ansätzen ohne Zusatz von Bakterien gab es keinen Einfluss von SAHA und S2101 auf die IL-10 Produktion beider Lokalisationen. Die Konzentration von IL-10 lag stets unterhalb der Quantifizierungsgrenze, so dass keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

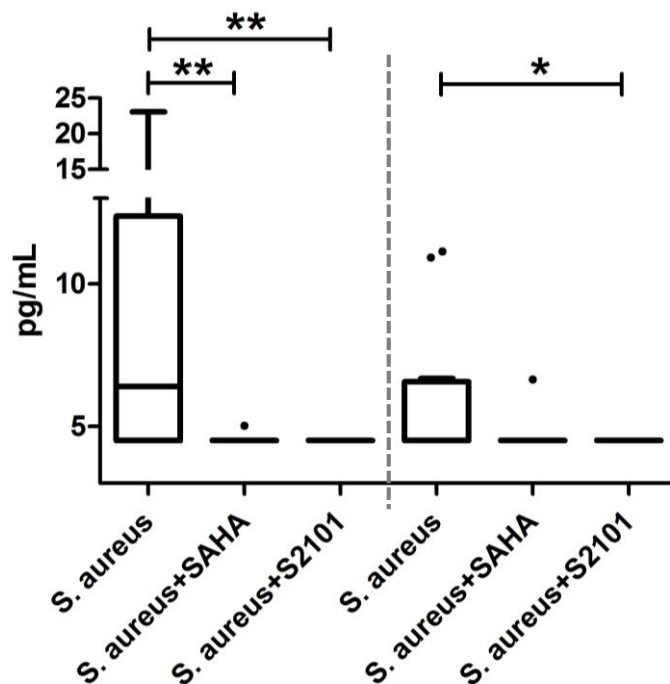
Die Konzentration von IL-10 in den Überständen der Explantkultur wurde nach Pathogenstimulation bei jedem Ansatz durch S2101 und nur im Bereich der ZZ durch SAHA reduziert. S2101 hemmte die von IL-10-Produktion nach *E.-coli*-Stimulation in der ZZ ( $P = 6,65 \cdot 10^{-9}$ ) und im EP ( $P = 0,0034$ ). Die Konzentration von IL-10 wurde durch SAHA nur im Bereich der ZZ reduziert ( $P = 5,19 \cdot 10^{-4}$ , Abbildung 23). Die Produktion von IL-10 wurde tendenziell von SAHA gehemmt ( $p = 0,068$ ).

Die Konzentration von IL-10 nahm auch durch den Zusatz von SAHA und S2101 nach *S.-aureus*-Stimulation ab (Abbildung 24). Durch S2101 erfolgte diese Abnahme signifikant in der ZZ ( $P = 0,0014$ ) und im EP ( $P = 0,038$ ). Durch SAHA wurde nur im Bereich der ZZ ( $P = 0,0036$ ) die Konzentration von IL-10 signifikant gemindert (Abbildung 24).



**Abbildung 23: Konzentration von IL-10 im Überstand *E. coli*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von IL-10 in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

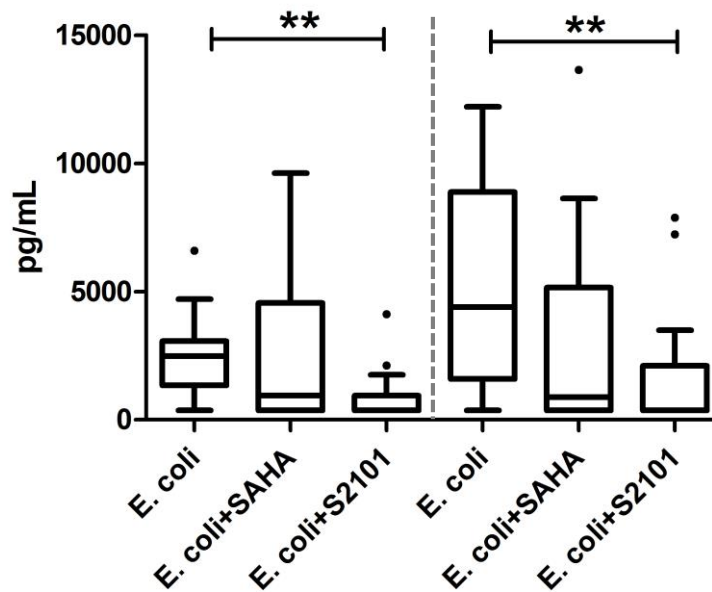


**Abbildung 24: Konzentration von IL-10 im Überstand *S. aureus*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von IL-10 in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

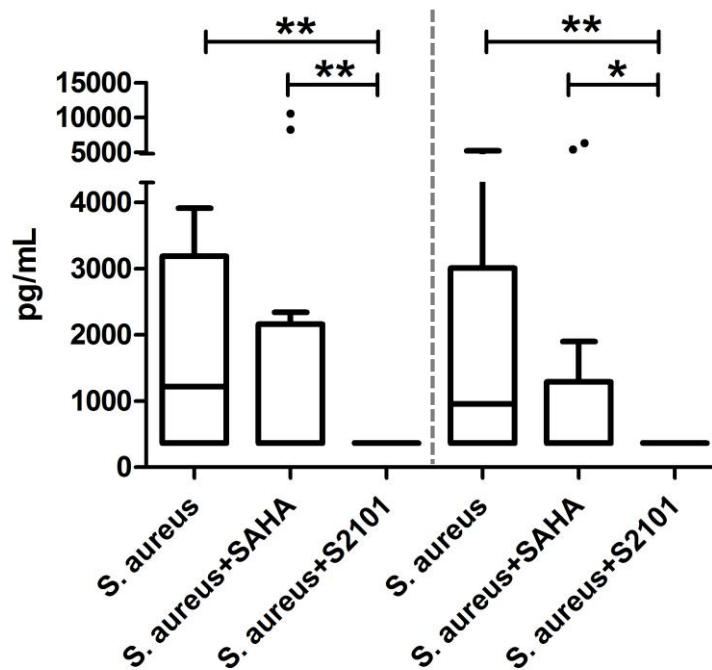
*TNF $\alpha$* 

S2101 hemmte die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  in der ZZ und im EP nach Pathogenstimulation. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration wurde durch S2101 statistisch signifikant nach *E.-coli*-Stimulation in der ZZ ( $P = 0,0016$ ) und im EP ( $P = 0,019$ ) gehemmt (Abbildung 25). Ähnlich zeigte sich dieser Effekt auch nach *S.-aureus*-Stimulation in der ZZ ( $P = 0,034$ ) und im EP ( $P = 0,034$ , Abbildung 26). SAHA zeigte keinen Einfluss auf die Pathogen-induzierte Produktion von  $\text{TNF}\alpha$ .



**Abbildung 25: Konzentration von  $\text{TNF}\alpha$  im Überstand *E.-coli*-stimulierter mamitärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von  $\text{TNF}$  in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



**Abbildung 26: Konzentration von TNF $\alpha$  im Überstand *S.-aureus*-stimulierter mammärer Explants in Anwesenheit von SAHA und S2101**

Dargestellt als Boxplot ist die Konzentration von TNF in pg/mL. Lokalisationen: links Zitzenzisterne, rechts Euterparenchym (jeweils  $n = 7$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05$  -  $0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01$  -  $0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

#### 2.2.4. Molekularbiologische Untersuchung der mammären Explants

Zitzenzisterne und Euterparenchym besitzen die Fähigkeit sich vor Erregern aus der Umwelt zu schützen. Um die Pathogen-induzierte Immunantwort beider Lokalisationen unter Anwesenheit epigenetisch wirksamer zu untersuchen, wurde die Expression fünf immunrelevanter Gene mittels RT-qPCR untersucht: das inflammatorische Chemokin *CXCL8*, das inflammatorische Zytokin *TNF*, das regulatorische Zytokin *IL10* und zwei Gene, die für Proteine mit antimikrobieller Wirkung kodieren, *S100A9* und *LAP*. Die jeweilige Basisexpression der fünf analysierten Gene wird Tabelle 12 wiedergegeben.

**Tabelle 12: Basisexpression fünf immunrelevanter Gene in der Zitzenzisterne und des Euterparenchyms**

|           | CXCL8 |        | IL-10 |        | TNF |       | S100A9 |        | LAP |       |
|-----------|-------|--------|-------|--------|-----|-------|--------|--------|-----|-------|
|           | MW    | SD     | MW    | SD     | MW  | SD    | MW     | SD     | MW  | SD    |
| <b>ZZ</b> | 16642 | ± 3293 | 2490  | ± 384  | 528 | ± 105 | 35014  | ± 9557 | 786 | ± 137 |
| <b>EP</b> | 40987 | ± 6140 | 7009  | ± 1657 | 368 | ± 85  | 26264  | ± 4307 | 530 | ± 177 |

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *CXCL8*, *IL-10*, *TNF*, *S100A9* und *LAP* ( $n = 7$  pro Gen). ZZ = Zitzenzisterne, EP = Euterparenchym, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

#### *RNA- und DNA-Qualität*

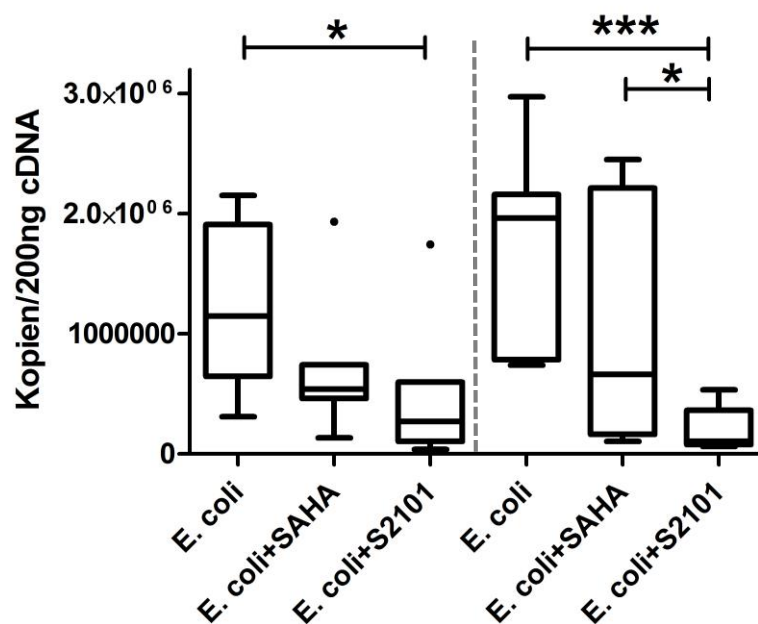
Die RNA-Qualität wurde mittels automatischer Elektrophorese mithilfe eines Chips und einer automatisierten Elektrophorese-Station von Experion® untersucht (III.3.8.2). Die RNA-Qualität war im Durchschnitt bei den Explants die aus der ZZ stammen höher als jene aus dem EP. Der RQI-Wert bei den Explants der ZZ lag zwischen 7,3 und 10,0 (MW = 8,84), mit einer Standardabweichung von 0,79. Der Mittelwert des RQI-Wertes des EP lag bei 7,94, mit einer Standardabweichung von 1,87. Es konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen festgestellt werden, die Anwesenheit von Bakterien (*E. coli* und *S. aureus*) oder der epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren (SAHA und S2101) zeigte keinen Einfluss auf die RNA-Qualität.

Die Qualität sowie die Konzentration der enthaltenen DNA wurde mittels Nanophotometer Pearl bestimmt (III.3.8.4). Die A260/280 Ratios in der ZZ lagen zwischen 1,583 und 1,650, Ratios des EP zwischen 1,610 und 1,643. Die Reinheit der DNA ist ab einer Ratio von 1,32 als gut (>90 % Reinheit) und bei >1,5 als sehr gut zu bezeichnen, deswegen konnte die DNA-Qualität im Rahmen dieser Arbeit als sehr gut bewertet werden.

*CXCL8*

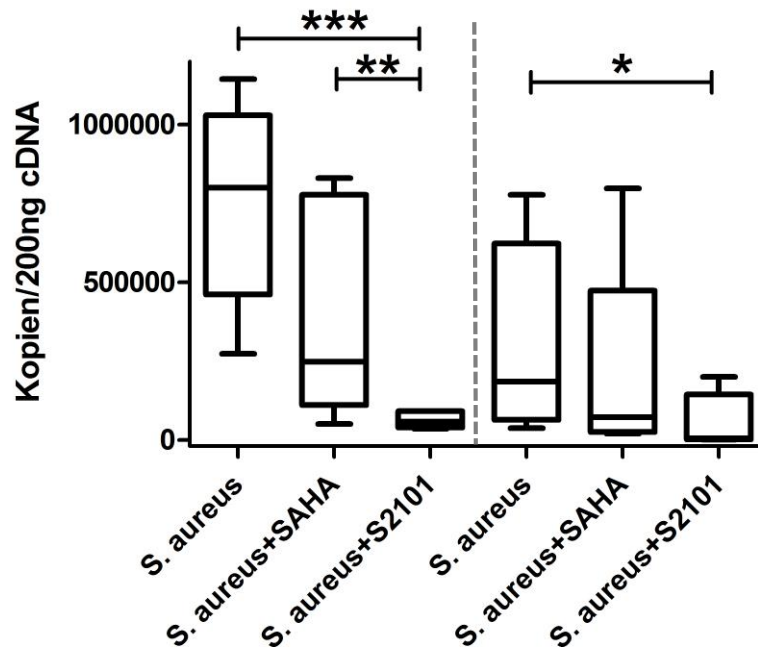
Für die Genexpression von *CXCL8* zeigt sich, dass S2101 sowohl in der ZZ als auch im Bereich des EP einen signifikanten Einfluss nach Pathogenkontakt hatte. Die mRNA-Expression für *CXCL8* wurde durch S2101 statistisch signifikant nach *E.-coli*-Stimulation in der ZZ ( $P = 0,026$ ) und im EP ( $P = 5,8 \cdot 10^{-4}$ ) herabreguliert (Abbildung 27). Das gleiche zeigte sich nach *S.-aureus*-Stimulation in der ZZ ( $P = 5,8 \cdot 10^{-4}$ ) und im EP ( $P = 0,017$ , Abbildung 28).

Der Zusatz von SAHA im Medium der Explantkultur hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von *CXCL8*.



**Abbildung 27: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *CXCL8*-Expression in mammaryären Explants nach *E.-coli*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *CXCL8* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



**Abbildung 28: Einfluss von SAHA und S2101 auf die CXCL8-Expression in mammären Explants nach *S. aureus*-Stimulation**

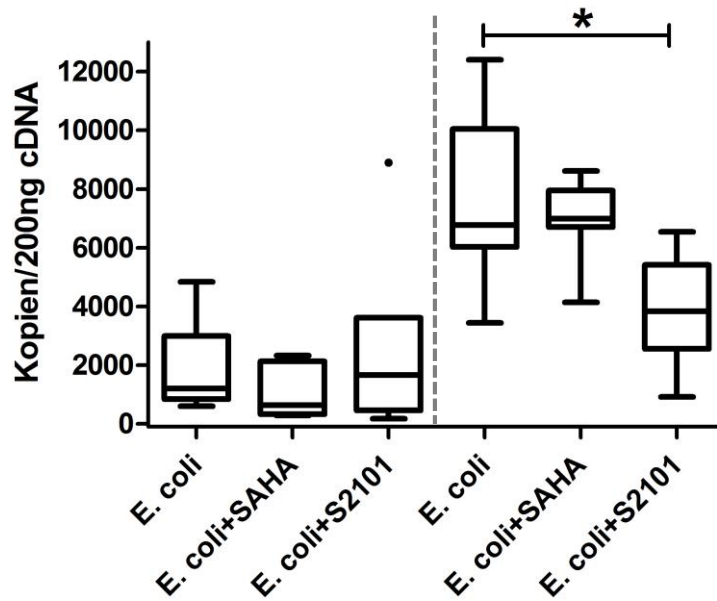
Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für CXCL8 ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

#### *IL-10*

Die Genexpression von *IL-10* wurde nur vergleichsweise schwach reguliert. Die Stimulation mit *E. coli* und *S. aureus* induzierte keine signifikante Heraufregulation von *IL-10* ( $P > 0,05$ ).

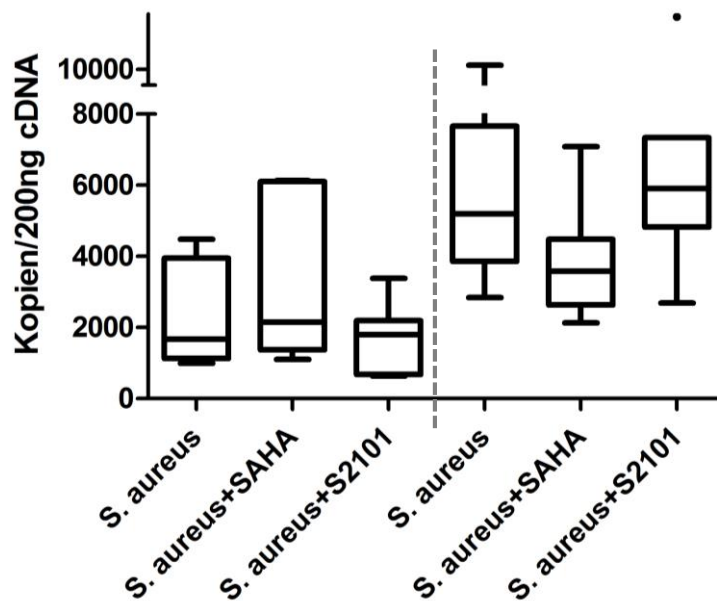
Der Zusatz von SAHA zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Genregulation von *IL-10* (Abbildung 29 und Abbildung 30). Der Zusatz von S2101 hemmte signifikant die *E. coli*-induzierte Genexpression von *IL-10* im EP ( $P = 0,017$ , Abbildung 29).





**Abbildung 29: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *IL-10*-Expression in mammarynären Explants nach *E.-coli*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *IL-10* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



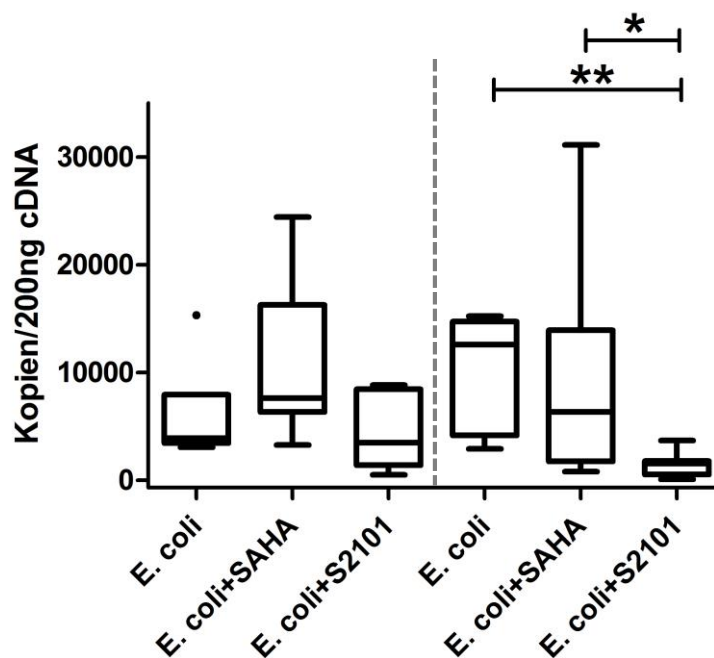
**Abbildung 30: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *IL-10*-Expression in mammarynären Explants nach *S.-aureus*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *IL-10* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

*TNF*

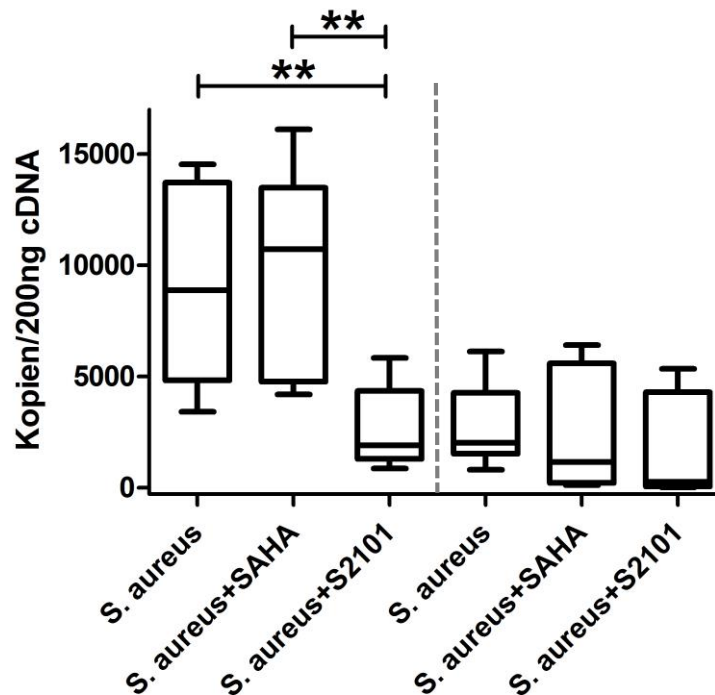
Der Zusatz von SAHA zeigte keinen Einfluss auf die Genexpression von *TNF* in den Lokalisationen ZZ und EP.

Bei den Ansätzen mit S2101 wurde einen Pathogen- und Lokalisations-abhängiger Effekt beobachtet: In Anwesenheit von *E. coli* wurde die Genexpression von *TNF* im EP signifikant herunterreguliert ( $P = 0,0012$ , Abbildung 31). In Anwesenheit von *S. aureus* wurde hingegen die Genexpression in der ZZ herunterreguliert ( $P = 0,007$ , Abbildung 32).



**Abbildung 31: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *TNF*-Expression in mamären Explants nach *E.-coli*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *TNF* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

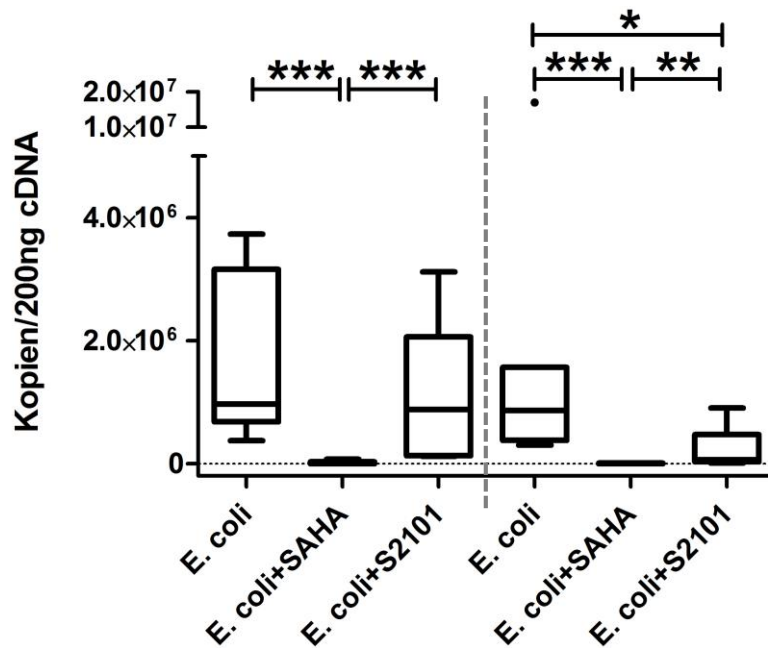


**Abbildung 32: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *TNF*-Expression in mammären Explants nach *S.-aureus*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *TNF* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

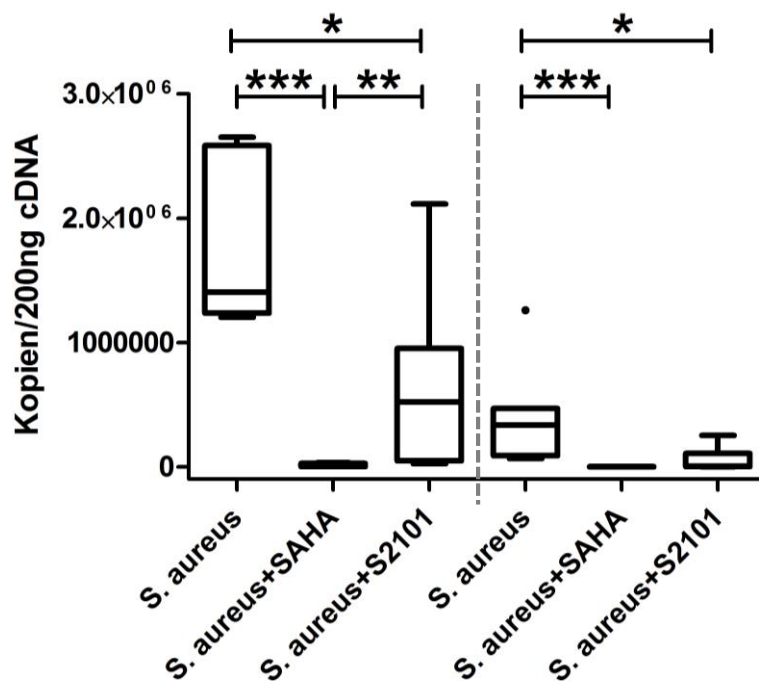
### *S100A9*

Die Genexpression von *S100A9* wurde nach Pathogen-Stimulation durch SAHA bei jedem Ansatz sowohl in der ZZ als auch im EP hoch signifikant herabreguliert ( $P = 5,8 \cdot 10^{-4}$ , Abbildung 33 und Abbildung 34). S2101 zeigte ebenfalls einen hemmenden Effekt, jedoch war diese Reduktion nicht so stark wie durch SAHA. Nach *E.-coli*-Stimulation führte S2101 nur im EP zur signifikanten Herabregulation von *S100A9* ( $P = 0,026$ , Abbildung 33). Bei den Ansätzen mit *S. aureus* wurde *S100A9* sowohl in der ZZ ( $P = 0,011$ ) als auch im EP ( $P = 0,011$ ) herabreguliert (Abbildung 34).



**Abbildung 33: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *S100A9*-Expression in mamären Explants nach *E.-coli*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *S100A9* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



**Abbildung 34: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *S100A9*-Expression in mamären Explants nach *S.-aureus*-Stimulation**

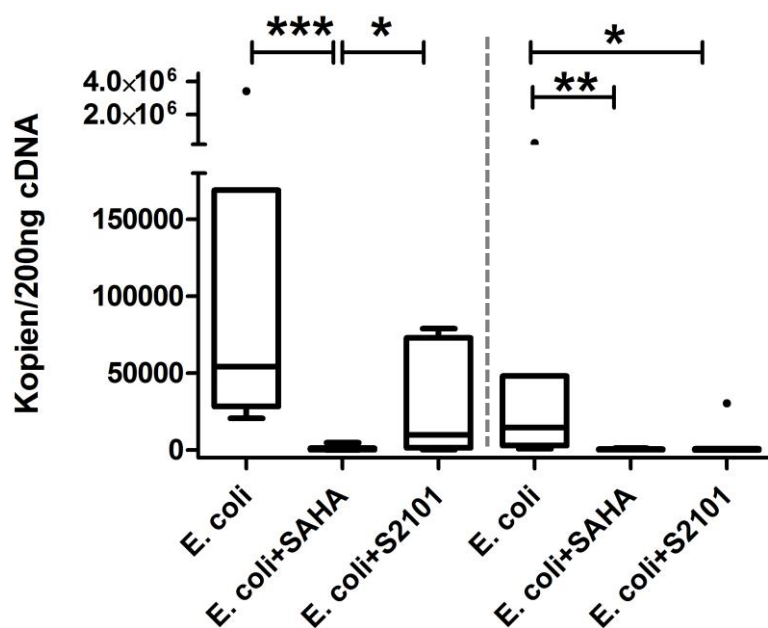
Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *S100A9* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

*LAP*

Die Genexpression für das antimikrobiell wirksame Defensin *LAP* wurde ähnlich wie für das ebenfalls antimikrobiell wirksame *S100A9* reguliert. SAHA hemmte bei jedem Ansatz die Expression von *LAP* während S2101 nur teilweise eine Herabregulation hervorrief.

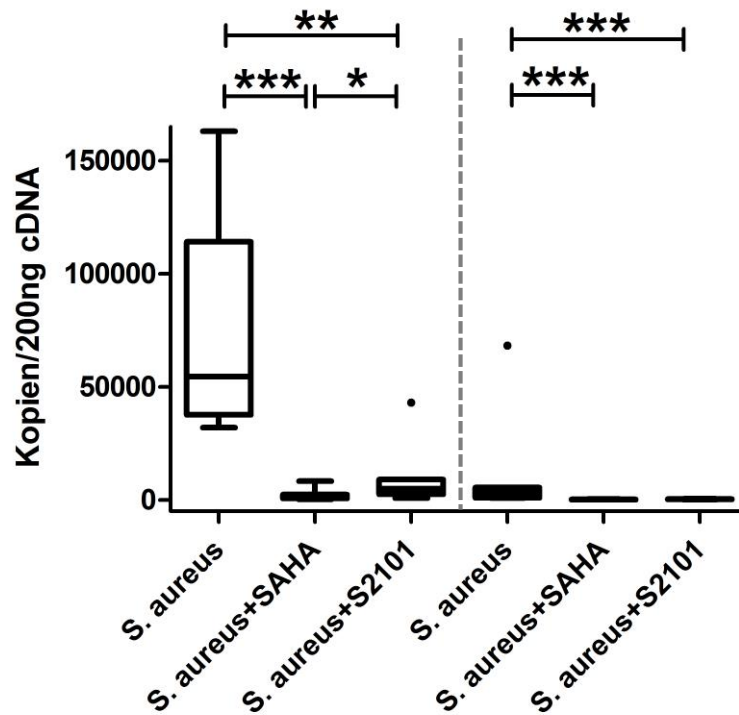
*LAP* wurde durch SAHA nach *E.-coli*- und *S.-aureus*-Stimulation sowohl in der ZZ als auch im EP hoch signifikant herabreguliert ( $P > 0,01$ , Abbildung 35 und Abbildung 36).

S2101 induzierte tendenziell nach *E.-coli*-Stimulation eine Herabregulation in der ZZ ( $P = 0,073$ ) und eine signifikante Herabregulation im EP ( $p = 0,017$ , Abbildung 35). Nach *S.-aureus*-Stimulation wurde *LAP* sowohl in der ZZ ( $P = 0,0023$ ), als auch im EP ( $P = 5,8 \cdot 10^{-4}$ ) signifikant herabreguliert (Abbildung 36).



**Abbildung 35: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *LAP*-Expression in mammaryären Explants nach *E.-coli*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *LAP* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .



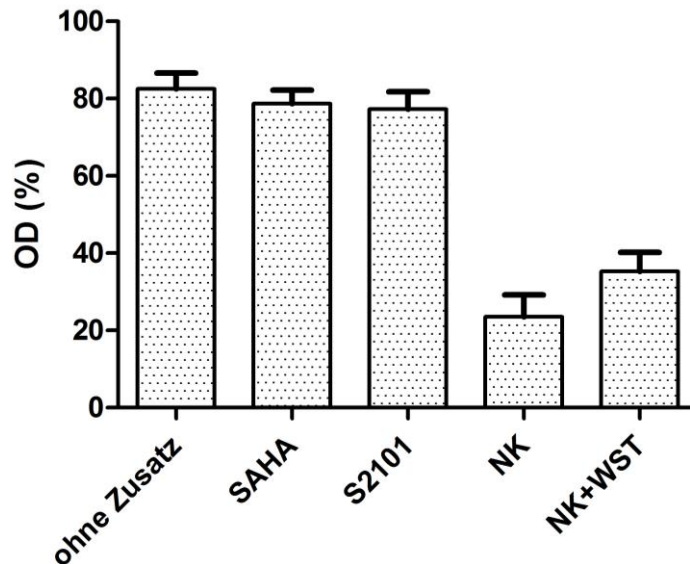
**Abbildung 36: Einfluss von SAHA und S2101 auf die *LAP*-Expression in mamären Explants nach *S.-aureus*-Stimulation**

Dargestellt ist die mRNA-Expression als Kopien/200 ng cDNA für *LAP* ( $n = 7$ ). Lokalisationen: links Zitzenzysterne, rechts Euterparenchym. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: \* =  $P < 0,05 - 0,01$ ; \*\* =  $P < 0,01 - 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

### 3. Vitalitätstest

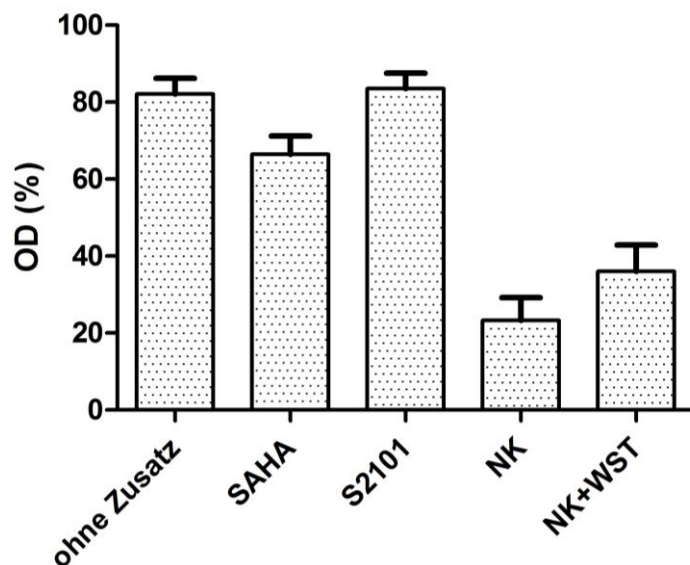
Wie im Abschnitt III.3.4 beschrieben, wurde die Vitalität der Explants nach Kultivierungsende mittels WST-1 Färbung überprüft (Versuche 9 und 10) und photometrisch ausgewertet. Durchgeführt wurde die Methode nur für die Versuche mit SAHA und S2101 mit der höheren Konzentration (Versuche 5 bis 8, III.3.3.1.2). Die Höhe der OD korreliert mit der Stoffwechselleistung der Explants und gilt als Indikator für Vitalität.

Die Vitalität der Explants aus der ZZ war sehr hoch und zeigte auch nach 36 h Inkubationszeit keine wesentliche Veränderung. Der größte Unterschied wurde bei den Explants beobachtet, denen SAHA zugesetzt wurde. Die OD sank um 10 % zum Ausgangswert (Abbildung 37 und Abbildung 38).



**Abbildung 37: Stoffwechselaktivität der Explants der Zitenzisterne nach 24 h Inkubation**

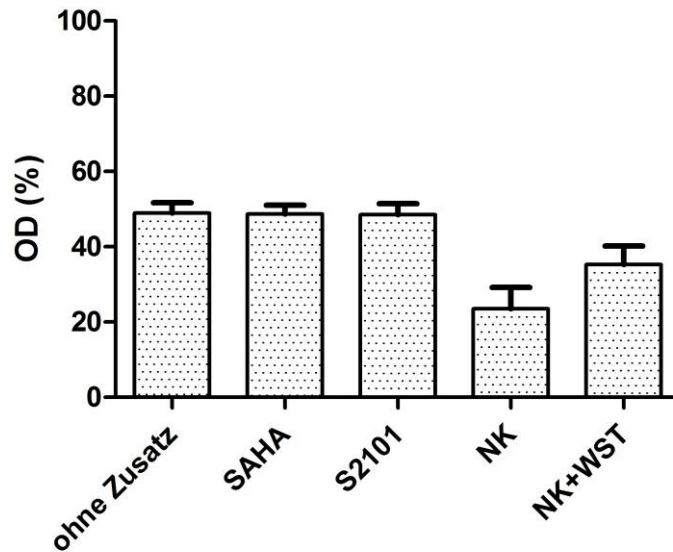
Dargestellt als Säulendiagramm ist die Optische Dichte (OD 600) in % bezogen auf den Ansatz ohne Zusätze. Die Säule „ohne Zusatz“ umfasst alle Ansätze kultivierter Explants ( $n = 9$ ) ohne epigenetisch wirksame Immunmodulatoren. Die Säulen SAHA und S2101 umfassen alle Ansätze kultivierter Explants (jeweils  $n = 9$ ), die jeweils mit SAHA oder S2101 koinkubiert wurden, die Säule NK umfasst nur Kulturmedium ohne Explants und die Säule NK+WST zeigt die OD von Kulturmedium mit Zusatz von 30  $\mu$ L WST.



**Abbildung 38: Stoffwechselaktivität der Explants der Zitenzisterne nach 36 h Inkubation**

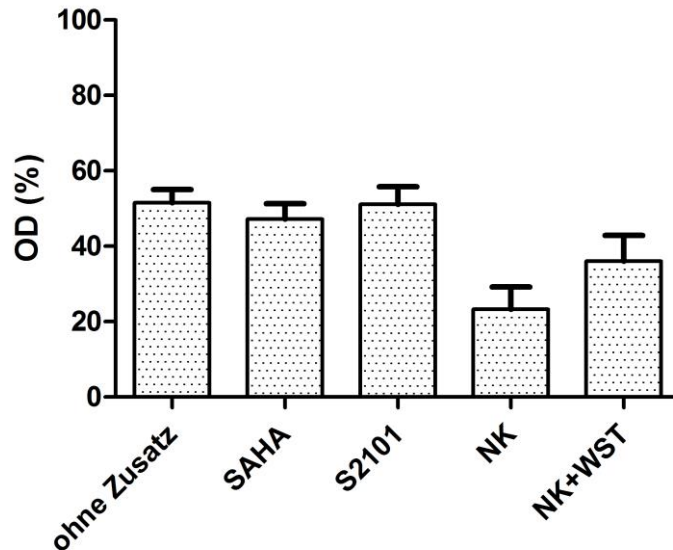
Dargestellt als Säulendiagramm ist die Optische Dichte (OD 600) in % bezogen auf den Ansatz ohne Zusätze. Die Säule „ohne Zusatz“ umfasst alle Ansätze kultivierter Explants ( $n = 9$ ) ohne epigenetisch wirksame Immunmodulatoren. Die Säulen SAHA und S2101 umfassen alle Ansätze kultivierter Explants (jeweils  $n = 9$ ), die jeweils mit SAHA oder S2101 koinkubiert wurden, die Säule NK umfasst nur Kulturmedium ohne Explants und die Säule NK+WST zeigt die OD von Kulturmedium mit Zusatz von 30  $\mu$ L WST.

Die Stoffwechselaktivität des EP war um etwa 30 %, niedriger als die der ZZ. SAHA zeigte auch hier wiederum einen geringen hemmenden Effekt (ca. 5 %) auf die Stoffwechselaktivität der Explants (Abbildung 39 und Abbildung 40).



**Abbildung 39: Stoffwechselaktivität der Explants des Euterparenchyms nach 24 h Inkubation**

Dargestellt als Säulendiagramm ist die Optische Dichte (OD 600) in % bezogen auf den Ansatz ohne Zusätze. Die Säule „ohne Zusatz“ umfasst alle Ansätze kultivierter Explants ( $n = 9$ ) ohne epigenetisch wirksame Immunmodulatoren. Die Säulen SAHA und S2101 umfassen alle Ansätze kultivierter Explants (jeweils  $n = 9$ ), die jeweils mit SAHA oder S2101 kokubiert wurden, die Säule NK umfasst nur Kulturmedium ohne Explants und die Säule NK+WST zeigt die OD von Kulturmedium mit Zusatz von 30  $\mu$ L WST.

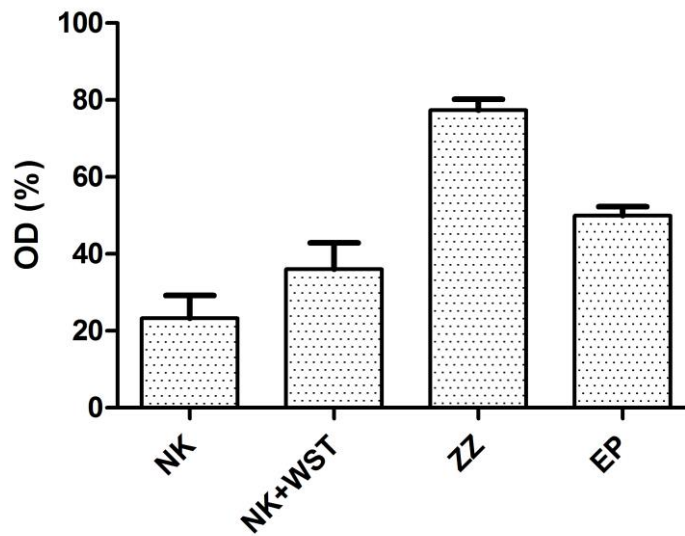


**Abbildung 40: Stoffwechselaktivität der Explants des Euterparenchyms nach 36 h Inkubation**

Dargestellt als Säulendiagramm ist die Optische Dichte (OD 600) in % bezogen auf den Ansatz ohne Zusätze. Die Säule „ohne Zusatz“ umfasst alle Ansätze kultivierter Explants ( $n = 9$ ) ohne epigenetisch wirksame Immunmodulatoren. Die Säulen SAHA und S2101 umfassen alle Ansätze kultivierter Explants (jeweils  $n = 9$ ), die jeweils mit SAHA oder S2101 kokubiert wurden, die Säule NK umfasst nur Kulturmedium ohne Explants und die Säule NK+WST zeigt die OD von Kulturmedium mit Zusatz von 30  $\mu$ L WST.



Die Unterschiede zwischen der Stoffwechselaktivität der beiden Lokalisationen der Explants wird in der Abbildung 41 vergleichend dargestellt.



**Abbildung 41: Vergleich der Stoffwechselaktivität der Explants nach 36 h Inkubation zwischen der Zitenzisterne und des Euterparenchyms**

Dargestellt als Säulendiagramm ist die Optische Dichte (OD 600) in % bezogen auf den Ansatz ohne Zusätze. Die Säule ZZ umfasst alle Ansätze kultivierter Explants ( $n = 27$ ) der Zitenzisterne. Die Säule EP umfasst alle Ansätze kultivierter Explants (jeweils  $n = 27$ ) des Euterparenchyms. Die Säule NK umfasst nur Kulturmedium ohne Explants und die Säule NK+WST zeigt die OD von Kulturmedium mit Zusatz von 30  $\mu$ L WST.

## V. DISKUSSION

Die Mastitis beim Rind ist eine der wichtigsten Krankheiten in Milchviehbetrieben weltweit (HALASA et al., 2007). Mastitiserreger dringen überwiegend über die Zitze ins Euter ein, verursachen eine intramammäre Infektion und lösen entweder eine lokal begrenzte oder systemische Immunreaktion aus, die sich als Mastitis äußert (SCHUKKEN et al., 2011). Um intramammären Infektionen entgegenzuwirken, werden Mastitiden nach wie vor am häufigsten mittels Antibiotika behandelt (GOMES & HENRIQUES, 2016). Der Antibiotikaeinsatz gilt in der öffentlichen Wahrnehmung zunehmend als ein Problem hinsichtlich der Entwicklung von Resistenzen. Weiterhin ist die Therapie mit Antibiotika bei intramammären Infektionen nicht immer erforderlich oder notwendig, wie z.B. bei chronischen durch *S. aureus* hervorgerufenen Mastitiden (PETZL et al., 2018). Deswegen werden neue Wege für die Mastitistherapie und -prophylaxe erforscht. Der Einsatz von Immunmodulatoren gilt dabei als eine vielversprechende Alternative gegenüber der herkömmlichen Antibiotikabehandlung (MALINOWSKI, 2002; TREVISI et al., 2014). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, epigenetisch wirksame Immunmodulatoren auf ihre Eignung zu testen, die angeborene Immunantwort von mammärem Gewebe gegenüber Mastitiserregern zu optimieren.

### **1.1. Epigenetisch wirksame Substanzen modulieren die Immunantwort von mammärem Gewebe gegenüber Mastitiserregern *in vitro***

Die Gewinnung und Kultivierung boviner Euter- und Zitzenexplants war ein zentrales Modell im Rahmen dieser Arbeit. Die Methodik war bereits im Vorfeld bei verschiedenen Studien zur angeborenen Immunität im Euter eingesetzt worden (RABOT et al., 2007; MOUNT et al., 2009; LIND et al., 2015; MAGRO et al., 2017) und konnte nunmehr vor dem Hintergrund der gezielten Immunmodulation weiterentwickelt werden. Die Euterbiopsien wurden aus der Zitze und dem Euterparenchym nach der Schlachtung der Probanden gewonnen und unmittelbar nach dem Transport im Labor weiterverarbeitet. Nach Inkubation und Stimulation der Explants (III.3.3.4) konnte die Regulation immunrelevanter Faktoren sowohl auf Transkriptebene, als auch auf Produktebene und funktioneller Ebene untersucht

werden. Die Überstände wurden für die funktionellen Methoden (III.3.5, 3.6) und für den Produktnachweis (3.7) benutzt; die RNA-fixierten Explants wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen aufbewahrt (3.8).

Da bekanntermaßen die Gewebezusammensetzung zwischen Explants der gleichen Lokalisation variieren kann (LIND et al., 2015) und vor allem bei molekularbiologischen Analysen mit einer nennenswerten Variabilität zu rechnen war, wurden die Ansätze in unabhängigen Duplikaten durchgeführt (III.3.8.1). Die Homogenisierung und RNA-Extraktion der Explants konnte anschließend bei „gepoolten“ Proben durchgeführt werden.

Die Stimulation der Explants erfolgte mit zwei sehr relevanten Mastitisserregern: *E. coli* und *S. aureus* (SCHUKKEN et al., 2011; MODAK et al., 2012; THOMPSON-CRISPI et al., 2014). Seit langem ist bekannt, dass beide Erreger ein gegensätzliches Erkrankungsbild hervorrufen (PETZL et al., 2008) und eine unterschiedlichere Aktivierung der Entzündungskaskade nach Erregererkennung induzieren (GUNTHER et al., 2017a). Die angewendete Dosis enthielt  $10^6$  hitzeinaktivierte Partikel/mL von *E. coli* 1303 und *S. aureus* 1027. Sowohl beide Bakterienstämme, als auch die verwendete Konzentration waren in Vorstudien bereits erfolgreich eingesetzt worden (GUNTHER et al., 2009).

Um mögliche Kontaminationen mit anderen Bakterien bei der Explantkultur zu vermeiden, wurde von jedem Spendertier eine mikrobiologische Untersuchung der Milch sowie der Zitzenschleimhautoberfläche mittels eines Tupfer durchgeführt. Zusätzlich wurde dem Medium der kultivierten Explants ein Antibiotikum und ein Antimykotikum hinzugefügt (III.2.11.2). Im Falle, dass ein untersuchtes Viertel bereits vorher Pathogen-Kontakt gehabt hätte wäre damit zu rechnen gewesen, dass es bereits im Vorfeld zu Änderungen der Genexpression immunrelevanter Gene gekommen wäre (BANNERMAN, 2009). Es ist bekannt, dass die Wirts-Pathogen-Interaktion eines Euterviertels die Reaktivität des benachbarten Euterviertels beeinflussen kann (PETZL et al., 2008). Deshalb wurde bei der Auswahl der Spendertiere für die Explants nicht nur die Milch des zu beprobenden Viertels, sondern die aller laktierenden Viertel mikrobiologisch untersucht.

Mittels ein Vitalitätstest (III.3.4) wurde weiterhin sichergestellt, dass das Eutergewebe 36 h nach Inkubationsbeginn nach wie vor einen aktiven Stoffwechsel

aufwies (CARMICHAEL et al., 1987). Der vergleichbar höhere Stoffwechsels der ZZ im Vergleich zum EP (IV.3) könnte damit begründet werden, dass der Anteil an Bindegewebe im EP höher liegt als bei der ZZ (WENDT et al., 1994).

Ein weiterer lokalisationsabhängiger Unterschied zwischen der ZZ und dem EP zeigte sich beim Chemotaxisassay. Bei Überständen von kultiviertem EP lag die Zahl gewanderter PMN höher als bei Überständen der ZZ (IV.2.2.1). Dies zeigte sich besonders deutlich bei den Negativkontrollen, in denen PMN im Schnitt geringere spontane Transmigrationsraten von < 5 % bei ZZ-Überständen zeigten im Gegensatz zu Transmigrationsraten von bis zu über 50 % bei EP-Überständen. Dieses Phänomen könnte durch die unterschiedliche histologische Beschaffenheit im EP und in der ZZ begründet sein (RINALDI et al., 2010; RYMAN et al., 2015). Hierbei ließe sich bis jetzt über die dafür verantwortlichen Zellen lediglich spekulieren. Eine andere Erklärung könnte die unterschiedlich starke Induzierbarkeit einer Reaktion sein, da gezeigt werden konnte, dass distal gelegene Abschnitte der Milchdrüse eine geringere Induzierbarkeit inflammatorischer Gene aufweisen als proximal gelegene (LIND et al., 2015).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Explants beider untersuchter Lokalisationen vital und funktionell intakt waren, zeigt sich während der RNA-Extraktion. Es konnte kein Unterschied zwischen den Explants hinsichtlich der RNA-Qualität festgestellt werden (IV.2.2.4). Die Integrität der RNA wies einen durchschnittlichen RQI von 7,6 sowohl in Explants vom EP als auch in der ZZ auf. Hiermit erfüllten sie die an die RT-qPCR gestellten Anforderungen (SIDOVA et al., 2015). Der Zusatz von hitzeinaktivierten Bakterien und von epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren zeigte keinen negativen Einfluss auf die RNA-Qualität von Explants. Hiermit kann die eingesetzte Methodik als valide angesehen werden.

Die Standardisierung der Spendertiere für die Explants erfolgte auf der Basis allgemein- und eutergesunder Kühe durch klinische und mikrobiologische Untersuchung. Die Faktoren Rasse, Zyklusstand, Laktationsnummer und -phase konnten im Rahmen dieser Studie nicht berücksichtigt werden. In zukünftigen Untersuchungen könnte man nach diesen zusätzlichen Faktoren weiter eingrenzen, da sie bekanntermaßen einen Einfluss auf die Wirtsantwort bei der Kuh haben können (SHAFER-WEAVER et al., 1999).

*Hitzeinaktivierte Partikel von E. coli und S. aureus induzieren eine Pathogen-spezifische Immunantwort in Explants von Zitzenzisterne und Euterparenchym*

Die Anwesenheit hitzeinaktivierter Partikel von *E. coli* und *S. aureus* induzierte eine vergleichsweise starke Entzündungsantwort in Explants aus der ZZ und dem EP *in vitro*. Hierbei zeigte sich insbesondere eine signifikante Heraufregulation der inflammatorischen Zytokine *CXCL8* und *TNF* (IV.2.2.4). Hierbei wurden die Zytokine stärker durch *E. coli* als durch *S. aureus* induziert. Als hauptverantwortliche Wirtszelle für die Zytokinausschüttung gilt hierbei die MEC (GUNTHER et al., 2016). Die hier vorgenommenen Untersuchungen an mammären Explants bestätigen die Ergebnisse aus Vorläuferstudien mit isolierten MEC. Die Genexpression inflammatorischer Zytokine und Chemokine bei MEC zeigte bisher invariant eine stärkere Induktion nach Kontakt mit *E. coli* als mit *S. aureus* (YANG et al., 2006; GUNTHER et al., 2009; GUNTHER et al., 2010). Diesem Phänomen liegt zugrunde, dass beide Erreger unterschiedliche Wege der Aktivierung des angeborenen Immunsystems einleiten (GUNTHER et al., 2017a). Deswegen ist die Ausprägung der messbaren Immunantwort im Eutergewebe nach Erregerkontakt und das Krankheitsbild auch unterschiedlich stark (YANG et al., 2008; GUNTHER et al., 2010; SCHUKKEN et al., 2011). Im Gegensatz zu *E. coli*, aktiviert *S. aureus* nicht die TLR-Signalkaskade in MEC und es erfolgt keine Heraufregulation des für viele Abwehrvorgänge wichtigen Transkriptionsfaktors NF-kappaB (GUNTHER et al., 2017a). Bei einer Studie von GUNTHER et al. (2011) wurden die gleichen Stämme von *E. coli* (1303) und *S. aureus* (1027) wie in der vorliegenden Arbeit verwendet. Hierbei wurde nachgewiesen, dass bei Stimulation von MEC mit *E. coli* die Hochregulation von Gentranskripten signifikant stärker ausgeprägt war als nach Stimulation mit *S. aureus*. Weiterhin induzierte *E. coli* eine signifikant höhere Anzahl an differentiell exprimierten Genen (306 DEG) im Gegensatz zu *S. aureus* (111 DEG). Die Unterschiede zwischen der Immunantwort von MEC gegenüber *E. coli* und *S. aureus* sind nicht nur auf den gesamten Erreger beschränkt, sondern zeigen sich auch gegenüber ihren Zellwandbestandteilen LPS und LTA. So konnte gezeigt werden, dass LPS zu höheren Konzentrationen im Medium von IL-8 führte und signifikant stärkere Chemotaxis induzierte als LTA (LIND et al., 2015). In einem ähnlichen mammären bovinen Explantmodell wurde EP ebenfalls mit 10 µg/mL LPS stimuliert. Hier zeigte sich jedoch lediglich eine geringe Tendenz ( $P = 0,08$ ) bei der Genexpressionsteigerung von *CXCL8* (MOUNT et al., 2009).

Dieser Unterschied zu der vorliegenden Arbeit könnte dadurch erklärt werden, dass *E. coli* stärker als LPS die MEC aktiviert (ELAZAR et al., 2010). Weiterhin kann die Toxizität von LPS Pathogen-abhängig stark variieren.

Die Stimulation von Explants mit *E. coli* und *S. aureus* im Medium induzierte nicht nur die inflammatorischen Zytokine, sondern auch endogene AMP. Das Defensin *LAP* und *S100A9* wurden sowohl in der ZZ als auch im EP durch *E. coli* signifikant heraufreguliert. *S. aureus* induzierte lediglich in der ZZ signifikant die Expression beider AMP (IV.2.2.4).

In vorangegangenen Studien waren ähnliche Ergebnisse beobachtet worden. Die Genexpression des wichtigsten mammären  $\beta$ -Defensins *LAP* wurde durch *S. aureus* lediglich leicht, durch *E. coli* jedoch stark im Euter und in MEC heraufreguliert (PETZL et al., 2008; LIU et al., 2011). Eine weitere Studie zeigte hingegen, dass sowohl *S. aureus* als auch *E. coli* die Genexpression von *LAP* vergleichbar im Euter steigerte (KAWAI et al., 2013). Bei einer Studie von GUNTHER et al. (2011) wurde nach *E.-coli*-Stimulation von MEC sowohl *CXCL8*, *TNF*, *LAP* als auch *S100A9* nach 24 h heraufreguliert. Nach *S.-aureus*-Stimulation wurde nur die RNA-Abundanz von *CXCL8* und *TNF* erhöht, allerdings fand die Hochregulation bei *TNF* nur in den ersten sechs Stunden nach Stimulation statt.

Wider Erwarten unterlag das regulatorische Zytokin *IL-10* keiner Regulation nach Stimulation mit *E. coli* oder *S. aureus*. Auf Transkriptebeine ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen beobachten. Auf Produktebene konnte lediglich in Überständen der ZZ höhere *IL-10*-Werte als in Überständen des EP konstatiert werden (IV.2.2.3). Diese Unterschiede waren jedoch unabhängig vom Stimulationsansatz. Auch in der Literatur gibt es gegensätzliche Beobachtungen zur Regulation von *IL-10* im Euter: So berichten Autoren von einer stark erhöhten *IL-10* Produktion nach *E.-coli*-Infektion und einer geringgradig erhöhten *IL-10*-Produktion nach *S.-aureus*-Infektion (BANNERMAN, 2009). In einer anderen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass weder *E. coli* noch *S. aureus* die Genexpression für *IL-10* im Euter erhöhte (YANG et al., 2008).

### *Epigenetisch wirksame Immunmodulatoren verändern die Reaktivität mammären Gewebes in vitro*

Epigenetisch wirksame Immunmodulatoren können alleine oder kombiniert mit anderen Medikamenten gegen verschiedene Krankheiten bei Menschen und Tieren eingesetzt werden (MALINOWSKI, 2002; WILSON et al., 2017). Bei der Kuh sowie in anderen Tiermodellen wurden schon einige Studien über den Einfluss von VitD<sub>3</sub> auf das Immunsystem durchgeführt (CANTORNA et al., 2004; TELLEZ-PEREZ et al., 2012; ALVA-MURILLO et al., 2014; YUE et al., 2017). Über die Wirkung von SAHA und S2101 wurde bisher lediglich eine Studie *in vitro* an MEC durchgeführt (GUNTHER et al., 2017b). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit von SAHA und S2101 an *ex vivo* gewonnenem Gewebe unterschiedlicher boviner mammärer Kompartimente zu testen.

Es wurden zwei verschiedene Versuche mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Immunmodulatoren S2101 und SAHA durchgeführt. Die Wahl der Konzentrationen erfolgte in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Studie zu MEC (GUNTHER et al., 2017b). Bei der niedrigeren Konzentration (Versuch Nr. 3 und 4) war kein signifikanter Einfluss der Immunmodulatoren auf die Immunantwort der Explants zu beobachten (III.3.3.1.2). Aufgrund dessen werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Versuche 5 bis 8 diskutiert.

### *S2101 hemmt stark die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine aber auch geringgradig die Expression antimikrobieller Peptide*

Derzeit gibt es noch kein kommerziell erhältliches Präparat welches S2101 enthält. Verschiedene Studien berichten aber über seine immunsuppressive Wirkung (LI et al., 2015; FENG et al., 2016; SATO et al., 2017). Wir konnten zeigen, dass in beiden untersuchten Lokalisationen (ZZ und EP) die Genexpression des Chemokins CXCL8 und des Zytokins TNF nach Pathogen-Kontakt signifikant gehemmt wurde (IV.2.2.4). Der Produktnachweis mittels AlphaLISA<sup>®</sup> zeigte ebenfalls, dass nach Kontakt mit *E. coli* und *S. aureus* die Explants weniger IL-8 und TNFα produzierten (IV.2.2.3). Die Hemmung der Chemokinexpression (Minderung der Genexpression und der geringere Produktnachweis von IL-8) korrelierte mit den Ergebnissen der funktionellen Methoden des Chemotaxisassays und der Fluo-4 Färbung (IV.2.2.1, IV.2.2.2). Diese Übereinstimmung zwischen den verwendeten



Methoden rundete das Bild ab, und zeigte die deutliche entzündungshemmende Wirkung von S2101 umfassend zum ersten Mal im bovinen System auf. Der enge Zusammenhang von RNA-Transkripten, Proteinebene und Funktionalität von IL-8 war im Vorfeld für die bovine Zitze bereits gezeigt worden (LIND et al., 2015).

Die Ergebnisse der Fluo-4 Färbung stimmten mit denen des Chemotaxisassays überein (IV.2.2.1, IV.2.2.2). Dennoch ist sie „unspezifischer“ als der Chemotaxisassay, da lediglich die Öffnung von Kalzium-Kanälen in PMN gemessen wird. Ein Vorteil gegenüber dem Chemotaxisassay ist jedoch, dass sich der Einfluss von Kulturüberständen auf PMN direkt messen lässt und in kurzer Zeit eine Vielzahl an Daten erhoben werden können. Aufgrund des vergleichbar höheren „Hintergrundrauschens“ und der aufwändigeren Auswertung der Messung (für jede Probe müssen die Werte neu angepasst werden, III.3.6.3) bleibt der Chemotaxisassay die zuverlässigere Methode für die Analyse von Euter-Explant-Überständen (PERSSON et al., 1993; LIND et al., 2015).

Neben der beobachteten Hemmung der Genexpression inflammatorischer Chemokine und Zytokine, wurde eine leichte Herabregulation ( $P < 0,05 - 0,01$ ) der zwei untersuchten AMP *LAP* und *S100A9* beobachtet (IV.2.2.4). *LAP* und *S100-Proteine* werden im Rahmen einer Mastitis stark heraufreguliert (GUNTHER et al., 2010; KOSCIUCZUK et al., 2014; LIND et al., 2015) und gelten wegen ihrer antimikrobiellen Potenz als erwünschte Faktoren zur Unterstützung der bakteriellen Ausheilung (SWANSON et al., 2004; SMOLENSKI et al., 2015). Ihre fehlende Heraufregulation in mammären Explants nach Zusatz von S2101 ist daher als ein unerwünschter Effekt zu interpretieren.

Die Hypothese, dass die nach Zugabe von S2101 beobachtete Minderung der Zytokin- und Chemokinproduktion aufgrund einer zytotoxischen Wirkung stattfand wurde durch die Durchführung eines Vitalitätstests an mammären Explants widerlegt (IV.3). Die Explants wurden mit 5 nM S2101 im Medium inkubiert und zeigten eine Stoffwechselleistung von über 50 %, vergleichbar mit Kontrollansätzen von Explants, die nur mit „Eutermium“ inkubiert wurden. Aus der Humanmedizin gibt es Untersuchungen, in der die Vitalität von Eierstockkrebszellen bei Konzentrationen von 50 und 150 nM S2101 höher als 80 % lag. Nach 24-stündiger Inkubation lag sie immer noch höher als 50 %. Bei Konzentrationen von



200 nM war die Zellproliferation jedoch deutlich reduziert. Diese Minimierung der Vitalität basierte größtenteils auf Apoptose und Autophagie (FENG et al., 2016).

*SAHA hemmt geringgradig die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine und stark die Expression antimikrobieller Peptide*

SAHA ist für die Behandlung von Lymphomen bei Menschen in den USA zugelassen. Auch für SAHA ist eine immunsuppressive Wirkung beschrieben (BOLDEN et al., 2006; HEGEDUS et al., 2017; SHIEH et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine immunmodulatorische Wirkung für SAHA im bovinen System gezeigt werden. Im Gegensatz zu S2101 hemmte SAHA jedoch nicht statistisch signifikant die Pathogen-induzierte Heraufregulation von *CXCL8* und *TNF* in mammären Explants (IV.2.2.4). Eine hemmende Wirkung auf die Immunantwort wurde in dieser Studie nur durch die signifikante Reduktion chemotaktischer Faktoren in Überständen Pathogen-stimulierter Explants beobachtet (IV.2.2.1). Eine vergleichbare Korrelation zwischen den Ergebnissen der Transkript-, Produkt- und Funktionsebene, wie für S2101 beobachtet, ließ sich auch für SAHA erkennen.

SAHA zeigte in anderen Modellen auch antiinflammatorische Effekte. Die Expression von *TNF* und *IL-1* wurde bei Patienten mit Knochenmarkstransplantation nach Behandlung mit SAHA minimiert (BOLDEN et al., 2006). In einem murinen Modell wurden jeweils 5 und 50  $\mu$ M SAHA *in vivo* appliziert. SAHA zeigte antiinflammatorische Effekte im Plasma von behandelten Ratten, unter anderem die Reduktion von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-10}$  (IYER et al., 2010).

Ähnlich wie bei S2101, hemmte SAHA hoch signifikant die Genexpression der in dieser Studie analysierten AMP *S100A9* ( $P < 0,001$ ) und *LAP* ( $P < 0,01$ , IV.2.2.4). Auch hier ist dieser Effekt ähnlich wie bei S2101 als unerwünscht anzusehen.

In gleicher Weise wie bei S2101, wurde auch die Toxizität von SAHA auf die mammären Explants in einem Vitalitätstest überprüft. SAHA zeigte in der eingesetzten Dosis von 50 nM keinen negativen Effekt auf die die Vitalität der mammären Explants (IV.3). In einem anderen Modell mit caninen kornealen Fibroblasten rief eine Dosis von 25 nM SAHA oder weniger keine Toxizität hervor (BOSIACK et al., 2012).

*VitD<sub>3</sub> zeigt keinen Effekt auf die Pathogen-spezifische Immunantwort von Euter- und Zitzengewebe in vitro*

VitD<sub>3</sub> hat einen vielschichtigen Einfluss auf den Metabolismus und die Physiologie von Organismen. In den letzten Jahren wurde in zunehmendem Maße seine Relevanz sowohl für das angeborene als auch das erworbene Immunsystem erkannt (O'BRIEN & JACKSON, 2012).

Auch im Tiermodell wurde der Einfluss von VitD<sub>3</sub> auf das Immunsystem erforscht. In einem murinen Modell wurde festgestellt, dass VitD<sub>3</sub> einen Einfluss auf das Immunsystem hat und wirksam bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist (CANTORNA et al., 2004). In einer Studie zum Rind konnte durch intramammäre Applikation von VitD<sub>3</sub> die Schwere einer experimentellen *Sc.-uberis*-Mastitis gemildert werden (LIPPOLIS et al., 2011).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konzentration von VitD<sub>3</sub> (III.3.3.1.2) wurde bereits bei anderen Versuchen (LIPPOLIS et al., 2011; ALVA-MURILLO et al., 2014) als biologisch relevant und wirksam bezeichnet. Es zeigte sich, dass VitD<sub>3</sub> in diesen Konzentrationen keinen messbaren Effekt *in vitro* auf die Reaktivität mammärer Explants gegenüber *E. coli* und *S. aureus* hatte (IV.2.1). Deshalb wurden weitergehende Untersuchungen wie für SAHA und S2101 nicht mehr durchgeführt.

## **1.2. Methylierungs- und Acetylierungsmuster boviner PMN in Blut und Milch**

Epigenetische Regulierung der Genexpression spielt eine wesentliche Rolle bei der Modulation immunologischer Vorgänge in der Zelle (BAYARSAIHAN, 2011). Für ein besseres Verständnis der epigenetischen Immunmodulation bei der Mastitis, sollten bovine PMN vor und nach Migration zum entzündlichen Geschehen charakterisiert werden. PMN gelten als Haupteffektorzellen bei der bovinen Mastitis (PAAPE et al., 2002). Ihre Eigenschaft, Mikroorganismen zu töten, kann in der Milch signifikant reduziert sein (PAAPE et al., 2003). Ziel dieser Vorstudie war es, Hinweise auf Unterschiede im Methylierungs- und Acetylierungsmuster boviner PMN aus Blut und Milch zu erlangen. Wenn es ein „bekanntes“ Muster der epigenetischen Signatur von PMN gibt, könnte somit ein besseres Verständnis über ihre Funktionalität möglich sein. Die Anzahl aber vor allem auch die funktionelle

Kompetenz von PMN ist essenziell für die effektive Bekämpfung einer intramammären Infektion (SCHUKKEN et al., 2011). Die in dieser Arbeit verwendete ICIF-Färbung wurde bereits im Vorfeld bei bovinen Monozyten und Makrophagen etabliert. Dort konnte die unterschiedliche Expression epigenetischer, abhängig vom Zelltyp und der Laktationsphase der Kuh, nachgewiesen werden (RAUTMANN, 2015).

Von der epigenetischen Signatur der drei untersuchten Regionen H3K9ac, H3K4me<sub>3</sub> und H3K27me<sub>3</sub> in Milch-PMN kann man schlussfolgern, dass sich keine signifikanten Unterschiede zu Blut-PMNs feststellen lassen (IV.1.2). Jedoch lässt sich bis jetzt nicht schlussfolgern, dass es keine Änderungen der epigenetischen Signatur in PMN während ihrer Migration aus dem Blut in die Milchdrüse gibt. Es könnte überdies sein, dass die ICIF-Färbung für die Färbung von PMN weniger geeignet ist als bei Mononukleären Zellen, weil PMN einen sehr komplexen Zellkern aufweisen (OLINS et al., 2008).

### **1.3. Schlussbetrachtung und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit konnte erneut aufzeigen, dass die verwendete Methodik mit bovinen mammären Explants ein geeignetes Verfahren darstellt um die frühe Pathogen-spezifische Immunantwort bei der bovinen Mastitis zu untersuchen. Diese Erkenntnis deckt sich ebenfalls mit vorangegangenen Studien (RABOT et al., 2007; LIND et al., 2015; MAGRO et al., 2017). Unter Verwendung dieses Modells war es möglich, den Einfluss epigenetisch wirksamer Immunmodulatoren in der bovinen Milchdrüse zu untersuchen, ohne dafür einen aufwändigen und im Sinne der drei „Rs“ („Replace, Reduce, Refine“) vermeidbaren Tierversuch (FLECKNELL, 2002) vornehmen zu müssen. Das Modell konnte weiterhin durch Kombination von Untersuchungen auf Transkript-, Produkt- und Funktionsebene weiterentwickelt und validiert werden.

Diese Arbeit ist Teil eines Gesamtkonzepts zur Erforschung grundlegender Immunmechanismen bei der bovinen Mastitis. Als übergeordnetes Ziel gilt es, zukünftig den Einsatz von Antibiotika in der Milchproduktion zu verringern und das Tierwohl zu verbessern. Hiermit erfüllt diese Arbeit ebenfalls eine wichtige gesellschaftspolitische Aufgabe. Dies war jedoch nur durch umfassende Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe möglich (PETZL et al., 2008;

MITTERHUEMER et al., 2010; MÜHLBAUER, 2012; WALDMÜLLER, 2012; LIND et al., 2015; KRENITZ, 2018). Die zwei untersuchten epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren zeigten eine Minderung der akuten Entzündungsphase im Euter. Die Verwendung von SAHA oder S2101 könnte in Zukunft bei Mastitistherapie im Sinne einer Linderung schwerer Verlaufsformen helfen. Schmerzen, Leiden und Schäden entgegenzuwirken und das Tierwohl zu fördern sollte immer oberste Priorität in der Tiermedizin eingeräumt werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### *Untersuchungen in vitro zu epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren bei der Pathogen-spezifischen Mastitis des Rindes*

Die Mastitis ist eine der häufigsten und kostenintensivsten Erkrankungen bei Milchviehherden weltweit. Zwei der bedeutendsten Mastitiserreger sind *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Beide Erreger weisen eine unterschiedliche Pathogenese und klinische Ausprägung der Krankheit auf. Nach wie vor ist der Antibiotika-Einsatz in der Mastitisbekämpfung bei Milchkühen weltweit sehr hoch. Aufgrund aktueller Bestrebungen zur Antibiotika-minimierung bei Nutztieren werden neue Wege bei der Mastitistherapie und -prophylaxe gesucht. Dabei rückt die Modulation epigenetischer Mechanismen zunehmend in den Fokus. Während in der Humanmedizin bereits bei Vorliegen verschiedener Erkrankungen epigenetisch wirksame Modulatoren eingesetzt werden, ist über ihre Wirksamkeit in der Veterinärmedizin noch wenig bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Wirksamkeit verschiedener epigenetisch wirksamer Immunmodulatoren (VitD<sub>3</sub>, SAHA und S2101) auf Komponenten der angeborenen Immunantwort in mammären Geweben des Rindes zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war es, die epigenetische Signatur von polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) aus dem peripheren Blut und aus der Milch während einer Mastitis zu vergleichen.

Insgesamt wurden am Schlachthof 21 Kühe für die Studie ausgewählt und allgemein untersucht. Es erfolgte eine ausführliche Untersuchung des Euters und eine Milchprobenentnahme auf Viertelebene. Unmittelbar nach der Schlachtung wurden von den Versuchstieren Explants der Zitzenzisterne und des Euterparenchyms gewonnen. Nach dem Transport zum Labor erfolgte die Inkubation der Explants in Gegenwart oder Abwesenheit der drei epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren. Anschließend wurden die Explants mit den jeweils hitze-inaktivierten Mastitis-Pathogenen *E. coli* und *S. aureus* stimuliert. Nach 36 Stunden Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand für einen Produktnachweis auf Proteinebene (AlphaLISA®) und funktionelle Untersuchungen gewonnen. Diese

funktionellen Methoden umfassten einen Chemotaxisassay und die Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Influx mit bovinen PMN. Die Explants wurden RNA-fixiert und für molekularbiologischen Untersuchung verwendet. Nach der RNA- und DNA Qualitätsbestimmung erfolgte eine quantitative real time PCR. Um die Vitalität der Explants zu prüfen, erfolgte eine Stoffwechsel Aktivitätsbestimmung derselben während der Inkubation und Stimulation.

Für die Erfassung der epigenetischen Signatur von PMN wurde jeweils Blut und Milch von drei Kühen mit Mastitis gewonnen. Die Blut- und Milch-PMN wurden isoliert, fixiert und einer intrazellulären Immunfluoreszenz-Färbung gegen spezifische Histonregionen unterzogen.

Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programmes „R“, Version 3.2.3, durchgeführt. Um auf eine Normalverteilung der Daten zu prüfen, wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Bei einer Normalverteilung wurde zur weiteren Auswertung der t-Test verwendet, bei nicht normalverteilten Daten kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Der Vergleich normalverteilter und nicht normalverteilter Daten erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

Nach der Inkubation und Stimulation zeigten die Explants der Zitzenzisterne (76 %) und des Euterparenchyms (50 %) eine vergleichsweise hohe Stoffwechselaktivität. Weder der Zusatz hitzeinaktivierter Bakterien (*E. coli* und *S. aureus*) noch die untersuchten epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren (VitD<sub>3</sub>, SAHA und S2101) zeigten einen Einfluss auf die Vitalität der Explants.

Der Immunmodulator S2101 hemmte signifikant die Pathogen-induzierte Hochregulation der mRNA des Chemokins *CXCL8*, des Zytokins *TNF* ( $P < 0,05$ ) und der antimikrobiell wirksamen Peptide *S100A9* und *LAP*. Der Immunmodulator SAHA hemmte ähnlich wie S2101 die Hochregulation von *S100A9* und *LAP* ( $P < 0,01$ ) aber nicht signifikant die Hochregulation von *CXCL8* und *TNF*. Die Regulation des Zytokins *IL-10* wurde hingegen weder durch SAHA noch durch S2101 beeinflusst.

Die transkriptionelle Regulation von *CXCL8*, *TNF* und *IL-10* wurde auf Produktebene mittels AlphaLISA® und funktionell mit einem Chemotaxisassay und durch die Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Influx validiert.

Für VitD<sub>3</sub> konnte kein Effekt auf die untersuchten Komponenten des angeborenen Immunsystems im mammären Gewebe *in vitro* nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der epigenetischen Signatur von PMN zeigten sich nur geringe Unterschiede. Milch-PMN zeigten eine geringere Fluoreszenzintensität für H3K9ac als Blut-PMN. Hinsichtlich des Methylierungsmusters konnte kein Unterschied zwischen Blut- und Milch-PMN festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte erneut aufzeigen, dass die verwendete Methodik mit bovinen mammären Explants ein geeignetes Verfahren darstellt um die frühe Pathogen-spezifische Immunantwort bei der bovinen Mastitis zu untersuchen. Dies ermöglichte es, den Einfluss epigenetisch wirksamer Immunmodulatoren in der bovinen Milchdrüse zu untersuchen, ohne dafür einen aufwändigen und im Sinne der drei „Rs“ („Replace, Reduce, Refine“) vermeidbaren Tierversuch vornehmen zu müssen. Die epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren SAHA und S2101 agieren entzündungsmodulierend im mammären Gewebe, ihre Verwendung könnte in Zukunft bei der Mastitistherapie im Sinne einer Linderung schwerer Verlaufsformen helfen. Dadurch könnte eine Verminderung des Schweregrads der Erkrankung und eine Verbesserung des Tierwohls erreicht werden.

## VII. SUMMARY

### *In vitro assessment of epigenetic modifiers on bovine pathogen specific mastitis*

Mastitis is among the most important diseases in dairy cows. It accounts for large parts of antimicrobial drug use worldwide. Two of the most important mastitis pathogens are *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Due to the imminent normative to reduce the use of antimicrobial drugs in livestock, new ways for therapy and prophylaxis of mastitis are needed. Recently epigenetic regulation of inflammation by chromatin modifications has increasingly drawn attention. Currently assorted epigenetic modifiers have already been approved for the use in humans, however little is known about their actions in the bovine system.

The aim of this study was to investigate whether three selected epigenetic modifiers (ViD<sub>3</sub>, SAHA and S2101) influence the initial immune response towards mastitis pathogens in bovine udder tissue *in vitro*. Additionally, the epigenetic signature of polymorphonuclear neutrophils (PMN) should be identified for the better understanding of their role during pathogen control and abatement.

Tissue explants of the teat cistern and udder parenchyma were collected from 21 cows and were incubated for 36 hours in the absence and presence of epigenetic modifiers. Additionally, the tissue was stimulated with heat-inactivated particles of *E. coli* and *S. aureus*. After incubation, the explants were tested by RT-qPCR for transcript abundances of immune related candidate genes. Gene expression was validated in culture supernatants by an AlphaLISA<sup>®</sup> assay. Furthermore, the culture supernatants were analyzed for their chemotactic capacity through a chemotaxis assay and their ability to activate bovine PMN by measuring Ca<sup>++</sup>-influx. Statistical analysis of data was performed with the program “R” version 3.2.3.

For the epigenetic profiling of PMN, blood and milk samples of three cows with mastitis were collected. After isolation of PMN from blood and milk, the PMN were fixated and stained by intracellular immunofluorescence of specific histone regions.

After incubation and stimulation, the explants showed a comparably high metabolic activity in the teat cistern (76 %) and the udder parenchyma (50 %). The addition of pathogens (*E. coli* and *S. aureus*) or epigenetic modifiers (VitD<sub>3</sub>, SAHA and



S2101) did not affect to the metabolic activity of the explants.

The epigenetic modifier S2101 significantly inhibited the pathogen induced upregulation of transcripts for the chemokine *CXCL8*, the cytokine *TNF* ( $P < 0,05$ ) and the antimicrobial peptides *S100A9* and *LAP*. The epigenetic modifier SAHA inhibited the upregulation of *S100A9* and *LAP* ( $P < 0,01$ ) but did not inhibit the expression of *CXCL8* and *TNF*. The regulation of the cytokine *IL-10* was neither affected by SAHA nor S2101.

The transcriptional regulation of *CXCL8*, *TNF* and *IL-10* was validated through the product analysis by AlphaLISA<sup>®</sup> and functionally by a chemotaxis assay and the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -influx.

VitD<sub>3</sub> had no effect on the immune response of udder tissue *in vitro* after stimulation with mastitis pathogens.

The epigenetic signature of PMN showed just minor differences. The PMN from milk revealed a lower fluorescence intensity for H3K9ac than the PMN from blood. Regarding methylation there were no differences found between blood and milk PMN.

In conclusion these data show the potential of epigenetic modifiers (SAHA and S2101) to block overshooting inflammation in the udder. Thus, epigenetic modifiers may serve in future as immune modulators for the treatment and/or prophylaxis of clinical mastitis.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 499-511.

Alva-Murillo N, Tellez-Perez AD, Medina-Estrada I, Alvarez-Aguilar C, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE. Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial Pathogenesis* 2014; 77: 24-30.

Bannerman DD. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* 2009; 87: 10-25.

Bates AJ, Chambers G, Laven RA. Comparison of cephalonium alone and in combination with an internal teat sealant for dry cow therapy in seasonally calving dairy cows. *N Z Vet J* 2016; 64: 95-100.

Bayarsaihan D. Epigenetic Mechanisms in Inflammation. *Journal of Dental Research* 2011; 90: 9-17.

Bojang P, Ramos KS. The promise and failures of epigenetic therapies for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2014; 40: 153-69.

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006; 5: 769-84.

Bosiack AP, Giuliano EA, Gupta R, Mohan RR. Efficacy and safety of suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat) in the treatment of canine corneal fibrosis. *Veterinary Ophthalmology* 2012; 15: 307-14.

Breyne K, Steenbrugge J, Demeyere K, Lee CG, Elias JA, Petzl W, Smith DGE,

Germon P, Meyer E. Immunomodulation of Host Chitinase 3-Like 1 During a Mammary Pathogenic *Escherichia coli* Infection. *Front Immunol* 2018; 9: 1143.

Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003; 34: 521-64.

Cameron M, Keefe GP, Roy JP, Stryhn H, Dohoo IR, McKenna SL. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. *J Dairy Sci* 2015; 98: 2427-36.

Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 559-99.

Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1717S-20S.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47: 936-42.

Chang GJ, Zhang K, Xu TL, Jin D, Guo JF, Zhuang S, Shen XZ. Epigenetic Mechanisms Contribute to the Expression of Immune Related Genes in the Livers of Dairy Cows Fed a High Concentrate Diet. *PLoS One* 2015; 10: 19.

Collado R, Montbrau C, Moreno J, March R, Prenafeta A (2018) Efficacy of Ubac® vaccine against an experimental intramammary heterologous challenge in dairy heifers (bacterial count, SCC and serological response). In: National Mastitis Council, Milano.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.

Dinarello CA, Fossati G, Mascagni P. Histone deacetylase inhibitors for treating a spectrum of diseases not related to cancer. *Mol Med* 2011; 17: 333-52.

Dobbs KB, Rodriguez M, Sudano MJ, Ortega MS, Hansen PJ. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One* 2013; 8: e66230.

Elazar S, Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY. Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Research* 2010; 41: 12.

Feng SJ, Jin Y, Cui MJ, Zheng JH. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitor S2101 Induces Autophagy via the AKT/mTOR Pathway in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Medical Science Monitor* 2016; 22: 4742-8.

Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX* 2002; 19: 73-8.

Foster AE, Leen AM, Lee T, Okamura T, Lu A, Vera J, Atkinson R, Bollard CM, Dotti G, Rooney CM. Autologous designer antigen-presenting cells by gene modification of T lymphocyte blasts with IL-7 and IL-12. *J Immunother* 2007; 30: 506-16.

Gill BD, Zhu XJ, Indyk HE. The determination of vitamin D-3 and 25-hydroxyvitamin D-3 in early lactation and seasonal bovine milk. *International Dairy Journal* 2016; 63: 29-34.

Golder HM, Hodge A, Lean IJ. Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. *J Dairy Sci* 2016; 99: 7370-80.

Gomes F, Henriques M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology* 2016; 72: 377-82.

Gonzalez-Recio O, Ugarte E, Bach A. Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *PLoS One* 2012; 7: e51816.

Gonzalez RN, Cullor JS, Jasper DE, Farver TB, Bushnell RB, Oliver MN. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revues Canadienne De Recherche Veterinaire* 1989; 53: 301-5.

Gunther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Veterinary Research* 2009; 40: 14.

Gunther J, Liu SZ, Esch K, Schuberth HJ, Seyfert HM. Stimulated expression of TNF- $\alpha$  and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 135: 152-7.

Gunther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert HM. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Infect Immun* 2011; 79: 695-707.

Gunther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Koczan D, Goetze L, Seyfert HM. Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelial cells from cows. *BMC Genomics* 2012; 13

Gunther J, Koy M, Berthold A, Schuberth HJ, Seyfert HM. Comparison of the pathogen species-specific immune response in udder derived cell types and their models. *Veterinary Research* 2016; 47: 11.

Gunther J, Petzl W, Bauer I, Ponsuksili S, Zerbe H, Schuberth HJ, Brunner RM, Seyfert HM. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Sci Rep* 2017a; 7: 4811.

Gunther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Seyfert HM. TLR ligands, but not modulators of histone modifiers, can induce the complex immune response pattern of endotoxin tolerance in mammary epithelial cells. *Innate Immun* 2017b; 23: 155-64.

Gurao A, Kashyap SK, Singh R. beta-defensins: An innate defense for bovine mastitis. *Vet World* 2017; 10: 990-8.

Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly* 2007; 29: 18-31.

Hegedus L, Padanyi R, Molnar J, Paszty K, Varga K, Kenessey I, Sarkozy E, Wolf M, Grusch M, Hegyi Z, Homolya L, Aigner C, Garay T, Hegedus B, Timar J, Kallay E, Enyedi A. Histone Deacetylase Inhibitor Treatment Increases the Expression of the Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  Pump PMCA4b and Inhibits the Migration of Melanoma Cells Independent of ERK. *Frontiers in Oncology* 2017; 7: 13.

Hinthong W, Pumipuntu N, Santajit S, Kulpeanprasit S, Buranasinsup S, Sookrung N, Chaicumpa W, Aiumurai P, Indrawattana N. Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. *PeerJ* 2017; 5: e3431.

Iyer A, Fenning A, Lim J, Le GT, Reid RC, Halili MA, Fairlie DP, Brown L. Antifibrotic activity of an inhibitor of histone deacetylases in DOCA-salt hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* 2010; 159: 1408-17.

Jayani RS, Ramanujam PL, Galande S. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and

immunoblotting. *Methods Cell Biol* 2010; 98: 35-56.

Kawai K, Akamatsu H, Obayashi T, Nagahata H, Higuchi H, Iwano H, Oshida T, Yoshimura Y, Isobe N. Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 153: 298-301.

Koko KR, Chang SH, Hagaman AL, Fromer MW, Nolan RS, Gaughan JP, Zhang P, Carpenter JP, Brown SA, Matthews M, Bird D. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Cytotoxicity Towards Breast Tumors While Preserving the Wound-Healing Function of Adipose-Derived Stem Cells. *Annals of Plastic Surgery* 2017; 78: 728-35.

Konovalov S, Garcia-Bassets I. Analysis of the levels of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) mRNA in human ovarian tumors and the effects of chemical LSD1 inhibitors in ovarian cancer cell lines. *Journal of Ovarian Research* 2013; 6: 15.

Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 297-311.

Kosciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Krzyzewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Expression patterns of beta-defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Vet Res* 2014; 10: 14.

Krenitz J (2018) Untersuchungen zu endogenen antimikrobiellen Peptiden in der bovinen Milchdrüse. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Kromker V, Leimbach S. Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2017; 52 Suppl 3: 21-9.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.

Kumar N, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Sreela L, Mooventhan P, Sivaram M. Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Tropical Animal Health and Production* 2017; 49: 663-73.

Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollot C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 2007; 38: 12-21.

Laven RA, Balcomb CC, Tulley WT, Lawrence KE. Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off. *N Z Vet J* 2014; 62: 214-20.

Leitner G, Yadlin N, Lubashevsky E, Ezra E, Glickman A, Chaffer M, Winkler M, Saran A, Trainin Z. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 153-8.

Li A, He YZ, Sun S, Cai CF, Li HW. Lysine-specific demethylase 1 inhibitors protect cochlear spiral ganglion neurons against cisplatin-induced damage. *Neuroreport* 2015; 26: 539-47.

Lind M (2011) Etablierung und Anwendung einer Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer Vorgänge bei der Mastitis des Rindes. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Lind M, Sipka AS, Schuberth HJ, Blutke A, Wanke R, Sauter-Louis C, Duda KA, Holst O, Rainard P, Germon P, Zerbe H, Petzl W. Location-specific expression of chemokines, TNF-alpha and S100 proteins in a teat explant model. *Innate Immun* 2015; 21: 322-31.



Lippolis JD, Reinhardt TA, Sacco RA, Nonnecke BJ, Nelson CD. Treatment of an Intramammary Bacterial Infection with 25-Hydroxyvitamin D-3. *PLoS One* 2011; 6: 7.

Liu SZ, Shi XM, Bauer I, Gunther J, Seyfert HM. Lingual antimicrobial peptide and IL-8 expression are oppositely regulated by the antagonistic effects of NF-kappa B p65 and C/EBP beta in mammary epithelial cells. *Mol Immunol* 2011; 48: 895-908.

Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology* 2007; 212: 723-37.

Magro G, Brevini TAL, De Maglie M, Minozzi G, Scanziani E, Piccinini R. An explant of heifer mammary gland to study the immune response of the organ. *Res Vet Sci* 2017; 114: 44-50.

Malinowski E. The use of some immunomodulators and non-antibiotic drugs in a prophylaxis and treatment of mastitis. *Pol J Vet Sci* 2002; 5: 197-202.

McDougall S, Parker KI, Heuer C, Compton CWR. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Vet Microbiol* 2009; 134: 177-85.

McDougall S, Niethammer J, Graham EM. Antimicrobial usage and risk of retreatment for mild to moderate clinical mastitis cases on dairy farms following on-farm bacterial culture and selective therapy. *N Z Vet J* 2018; 66: 98-107.

Mehne D, Drees S, Schuberth H, Sauter-Louis C, Zerbe H, Petzl W. Accurate and rapid flow cytometric leukocyte differentiation in low and high somatic cell count milk. *Milchwissenschaft* 2010; 65: 235–8.

Middleton JR, Ma JN, Rinehart CL, Taylor VN, Luby CD, Steevens BJ. Efficacy

of different Lysigin (TM) formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. *Journal of Dairy Research* 2006; 73: 10-9.

Mimasu S, Umezawa N, Sato S, Higuchi T, Umehara T, Yokoyama S. Structurally Designed trans-2-Phenylcyclopropylamine Derivatives Potently Inhibit Histone Demethylase LSDI/KDM1. *Biochemistry* 2010; 49: 6494-503.

Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, Zerbe H, Blum H. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 2010; 11: 138.

Modak R, Das Mitra S, Krishnamoorthy P, Bhat A, Banerjee A, Gowsica BR, Bhuvana M, Dhanikachalam V, Natesan K, Shome R, Shome BR, Kundu TK. Histone H3K14 and H4K8 hyperacetylation is associated with *Escherichia coli*-induced mastitis in mice. *Epigenetics* 2012; 7: 492-501.

Modak R, Das Mitra S, Vasudevan M, Krishnamoorthy P, Kumar M, Bhat AV, Bhuvana M, Ghosh SK, Shome BR, Kundu TK. Epigenetic response in mice mastitis: Role of histone H3 acetylation and microRNA(s) in the regulation of host inflammatory gene expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Epigenetics* 2014; 6: 12.

Mount JA, Karrow NA, Caswell JL, Boermans HJ, Leslie KE. Assessment of bovine mammary chemokine gene expression in response to lipopolysaccharide, lipotechoic acid plus peptidoglycan, and CpG oligodeoxynucleotide 2135. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 2009; 73: 49-57.

Mühlbauer K (2012) Vergleichende Untersuchungen zu frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen bei akuter und subklinischer Mastitis des Rindes. . In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Nelson CD, Reinhardt TA, Lippolis JD, Sacco RE, Nonnecke BJ. Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* 2012; 4: 181-96.

O'Brien MA, Jackson MW. Vitamin D and the immune system: Beyond rickets. *Veterinary Journal* 2012; 194: 27-33.

Olins AL, Zwerger M, Herrmann H, Zentgraf H, Simon AJ, Monestier M, Olins DE. The human granulocyte nucleus: Unusual nuclear envelope and heterochromatin composition. *Eur J Cell Biol* 2008; 87: 279-90.

Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 2007; 54: 399-409.

Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 109-21.

Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.

Pereira UP, Oliveira DGS, Mesquita LR, Costa GM, Pereira U. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet Microbiol* 2011; 148: 117-24.

Persson K, Larsson I, Hallen Sandgren C. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 37: 99-112.

Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg G, Schuberth HJ.

*Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 2008; 39: 18.

Petzl W, Gunther J, Pfister T, Sauter-Louis C, Goetze L, von Aulock S, Hafner-Marx A, Schuberth HJ, Seyfert HM, Zerbe H. Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immun* 2012; 18: 467-77.

Petzl W, Gunther J, Muhlbauer K, Seyfert HM, Schuberth HJ, Hussen J, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Zerbe H. Early transcriptional events in the udder and teat after intra-mammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immun* 2016; 22: 294-304.

Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Seyfert HM, Hussen J, Schuberth HJ. Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Res Vet Sci* 2018; 116: 55-61.

Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 134: 208-17.

Rabot A, Wellnitz O, Meyer HH, Bruckmaier RM. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. *J Dairy Res* 2007; 74: 93-9.

Radbruch A (2000) Flow cytometry and cell sorting, 2nd edn. Springer, Berlin ; New York. xxiii, 355 p.

Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 2006; 37: 369-400.

Rato MG, Bexiga R, Nunes SF, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. J Dairy Sci 2008; 91: 4542-51.

Rautmann J (2015) Epigenetische Modulation boviner Monozyten und Makrophagen. In: Tierärztliche Hochschule, Hannover.

Reddy P. Targeting deacetylases to improve outcomes after allogeneic bone marrow transplantation. Trans Am Clin Climatol Assoc 2013; 124: 152-62.

Regenhard P, Petzl W, Zerbe H, Sauerwein H. The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. Vet Microbiol 2010; 143: 293-8.

Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MV, Paape MJ, Van Ryssen B, Burvenich C, Capuco AV. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. Funct Integr Genomics 2010; 10: 21-38.

Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. Adv Exp Med Biol 2000; 480: 247-58.

Rosenberger G (1990) Die klinische Untersuchung des Rindes, 3. edn. Parey, Hamburg.

Ryman VE, Packiriswamy N, Sordillo LM. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. Anim Health Res Rev 2015; 16: 135-49.

SAC C VS Disease Surveillance Report. Review of mastitis diagnoses in Scottish cattle in 2010. Vet Rec 2011; 168: 346-9.

Sander LE, Davis MJ, Boekschoten MV, Amsen D, Dascher CC, Ryffel B, Swanson JA, Muller M, Blander JM. Detection of prokaryotic mRNA signifies

microbial viability and promotes immunity. *Nature* 2011; 474: 385.

Sato T, Cesaroni M, Chung W, Panjarian S, Tran A, Madzo J, Okamoto Y, Zhang HH, Chen XW, Jelinek J, Issa JPJ. Transcriptional Selectivity of Epigenetic Therapy in Cancer. *Cancer Research* 2017; 77: 470-81.

Schukken YH, Hertl J, Bar D, Bennett GJ, Gonzalez RN, Rauch BJ, Santisteban C, Schulte HF, Tauer L, Welcome FL, Grohn YT. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2009; 92: 3091-105.

Schukken YH, Gunther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DGE, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM, Pfizer Mastitis Res C. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 270-89.

Schukken YH, Bronzo V, Locatelli C, Pollera C, Rota N, Casula A, Testa F, Scaccabarozzi L, March R, Zalduendo D, Guix R, Moroni P. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J Dairy Sci* 2014; 97: 5250-64.

Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN. Shedding pattern of *Staphylococcus-aureus* from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2785-9.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research* 2003; 34: 475-91.

Sepulveda-Varas P, Proudfoot KL, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Changes in behaviour of dairy cows with clinical mastitis. *Applied Animal Behaviour Science* 2016; 175: 8-13.

Shafer-Weaver KA, Corl CM, Sordillo LM. Shifts in bovine CD4(+) subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J Dairy Sci* 1999; 82: 1696-706.

Shieh JM, Tang YA, Hu FH, Huang WJ, Wang YJ, Jen J, Liao SY, Lu YH, Yeh YL, Wang TW, Lin PP, Wang YC. A histone deacetylase inhibitor enhances expression of genes inhibiting Wnt pathway and augments activity of DNA demethylation reagent against nonsmall-cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 2017; 140: 2375-86.

Sidova M, Tomankova S, Abaffy P, Kubista M, Sindelka R. Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomol Detect Quantif* 2015; 5: 3-9.

Smith GW, Lyman RL, Anderson KL. Efficacy of vaccination and antimicrobial treatment to eliminate chronic intramammary *Staphylococcus aureus* infections in dairy cattle. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* 2006; 228: 422-5.

Smith LC, Therrien J, Filion F, Bressan F, Meirelles FV. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R. *Front Genet* 2015; 6: 58.

Smolenski GA, Broadhurst MK, Stelwagen K, Haigh BJ, Wheeler TT. Host defence related responses in bovine milk during an experimentally induced *Streptococcus uberis* infection. *Proteome Sci* 2014; 12: 19.

Smolenski GA, Cursons RT, Hine BC, Wheeler TT. Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Vet Res* 2015; 46: 113.

Swanson K, Gorodetsky S, Good L, Davis S, Musgrave D, Stelwagen K, Farr V, Molenaar A. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide,

in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun* 2004; 72: 7311-4.

Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC, Singh K. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *J Dairy Sci* 2009; 92: 117-29.

Tellez-Perez AD, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE. Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Vet Microbiol* 2012; 160: 91-8.

Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front Immunol* 2014; 5: 493.

Trevisi E, Zecconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P, Amadori M. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Research in Veterinary Science* 2014; 96: 229-33.

Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 2014; 9: 803-15.

Van Schyndel SJ, Carrier J, Bogado Pascottini O, LeBlanc SJ. The effect of pegbovigrastim on circulating neutrophil count in dairy cattle: A randomized controlled trial. *PLoS One* 2018; 13: e0198701.

Vanselow J, Yang W, Herrmann J, Zerbe H, Schuberth HJ, Petzl W, Tomek W, Seyfert HM. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 463-77.



Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 10-3.

Waldmüller K (2012) Induktion einer mammären Endotoxintoleranz zur Mastitis-Prophylaxe bei der puerperalen Kuh. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs H-W. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1994: 226-44.

Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ. Escherichia coli isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3408-12.

Werling D, Piercy J, Coffey TJ. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 112: 2-11.

Wilson AL, Plebanski M, Stephens AN. New trends in anti-cancer therapy: combining conventional chemotherapeutics with novel immunomodulators. *Curr Med Chem* 2017;

Wilson DJ, Grohn YT, Bennett GJ, Gonzalez RN, Schukken YH, Spatz J. Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4282-8.

Wu CT, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science* 2001; 293: 1103-5.

Yang W, Molenaar A, Kurts-Ebert B, Seyfert HM. NF-kappa B factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine beta-defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. *Mol Immunol* 2006; 43:

210-25.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Guenther J, Draing C, von Aulocke S, Schuberth HJ, Seyfert HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E-coli*, but *S-aureus* fails to both activate NF-kappa B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF alpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008; 45: 1385-97.

Yin L, Chung WO. Epigenetic regulation of human beta-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 409-19.

Yue Y, Hymoller L, Jensen SK, Lauridsen C, Purup S. Effects of vitamin D and its metabolites on cell viability and *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol* 2017; 203: 245-51.

Zecconi A, Piccinini R, Fiorina S, Cabrini L, Dapra V, Amadori M. Evaluation of interleukin-2 treatment for prevention of intramammary infections in cows after calving. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 2009; 32:

## **IX. DANKSAGUNG**

Als erste Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Priv.-Doz. Wolfram Petzl dafür bedanken, dass ich bei der Mastitis Forschungsgruppe dabei sein konnte und in meiner Doktorarbeit ein so spannendes und aktuelles Thema bearbeiten durfte. Ich bedanke mich insbesondere für die Hilfsbereitschaft, seine immer gute Laune, egal ob bei Höhepunkten oder Tiefen während dieser Zeit, für das Dasein bei meinen Fragen, welche immer sofort beantwortet wurden (und es waren nicht wenige).

Zudem möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Zerbe bedanken. Er hat sich von Anfang an darum gekümmert, dass ich mich als Doktorandin mit meiner Arbeit und meinen Kollegen wohl fühle. Danke auch für jeden Rat, jedes positive und motivierende Wort und natürlich auch für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und meines Tierversuchsantrages.

Der Xunta de Galicia („Programa Galeuropa“), der Universität von Santiago de Compostela („Europracticum“) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG PE 1495/2-1) danke ich für die Finanzierung des Projektes.

Im Labor waren zwei Personen immer für mich da. Danke an Herrn Dr. Frank Weber, für die tausend Antworten auf ca. hundert Fragen. Danke an meine Sandra Kirsch; ich glaube an nichts, aber ich glaube an Sandra. Danke natürlich auch an Frau Ingrid Hartmann, nicht nur für die Vorinkubationen und die Hilfe im Labor, sondern auch für die Freizeitaktivitäten.

Wenn man aus einem anderen Land kommt und Familie und Freunde hinter sich lässt, ist es schön zu wissen, dass eine Art „Adoptivmutter“ für dich da ist. Danke an Frau Rita Radloff für die unzähligen Gefallen, Kopien und für die Hilfe beim gesamten Bürokratiechaos.

Einen besonderen Dank geht an Herrn Dr. Kyri und dem ganzen Schlachthofpersonal aus Buchloe. Ich hoffe, Herrn Kyri verliert nie den Enthusiasmus für die Tiermedizin, und die Freude an der Zusammenarbeit mit der Universität bei weiteren Forschungsprojekten.

Danke an das ganze LVG-Team, sowohl an Herrn Dr. Nüske sowie die Pfleger.

## XI. Danksagung

---

Danke an meine Krummenase, mein tapferes Spendertier, sie hat häppchenweise insgesamt 2.216 ml Blut für meine Versuche gespendet. Ruhe in Frieden im Kuhhimmel.

Danke an Frau Dr. Anna Rieger, die mir nicht nur Statistik beigebracht hat, sondern mich gelehrt hat, mich zu verbessern und meine eigenen Fehler zu entdecken.

Einen ganz großen Dank an Freddy, mein Leben wäre ganz anders verlaufen, wenn ich sie sowohl im Schloss als auch in der Arbeit nicht an meiner Seite gehabt hätte. Sie war meine „Kamera“, meine moralische Unterstützung und wie eine Schwester für mich.

Natürlich bedanke ich mich beim ganzen Klinikteam und insbesondere bei den Doktoranden die da waren und die noch da sind. Das Internzimmer war für mich immer ein Therapieraum und wenn man nicht mal voll produktiv war, sorgten die Couch und die Leute für gute Laune.

Danke an Frau Dr. Meyerholz für Ihre Hilfe, ihren Optimismus und Enthusiasmus für jede Aktivität, die sie beginnt. Du musst die „Nutella-Bombe patentieren!

Danke an meine Familie, die zwar vielleicht für eine (halb)spanische Familie klein ist, dafür aber ein riesengroßes Herz hat. Egal wie viele Kilometer uns trennen (650 oder 2.222 km), im Gefühl seid ihr immer bei mir. Ihr seid mein Vorbild, und eure Unterstützung und Motivation machen aus mir eine bessere Person. In Gedanken bin ich auch bei meinen beiden Opas, die nie aufgehört haben, an mich zu glauben.

Danke auch an den Flederhasen, meine Dolly, sie war die Konstante während meiner Doktorarbeit. Ein Blick von ihr reichte, damit es mir sofort wieder gut ging, wenn mal ein Stein im Weg lag.

Die hohe Arbeitslosigkeit und die komplizierte politische als auch soziale Lage während der Wirtschaftskrise in Spanien war grausam, hat mir aber die Entscheidung, das Land zu verlassen und ein neues Leben in Deutschland zu starten, einfacher gemacht. *Shit happens so always look at the bright side of life.*

**Danke**, thanks, gracias, **gracias**.